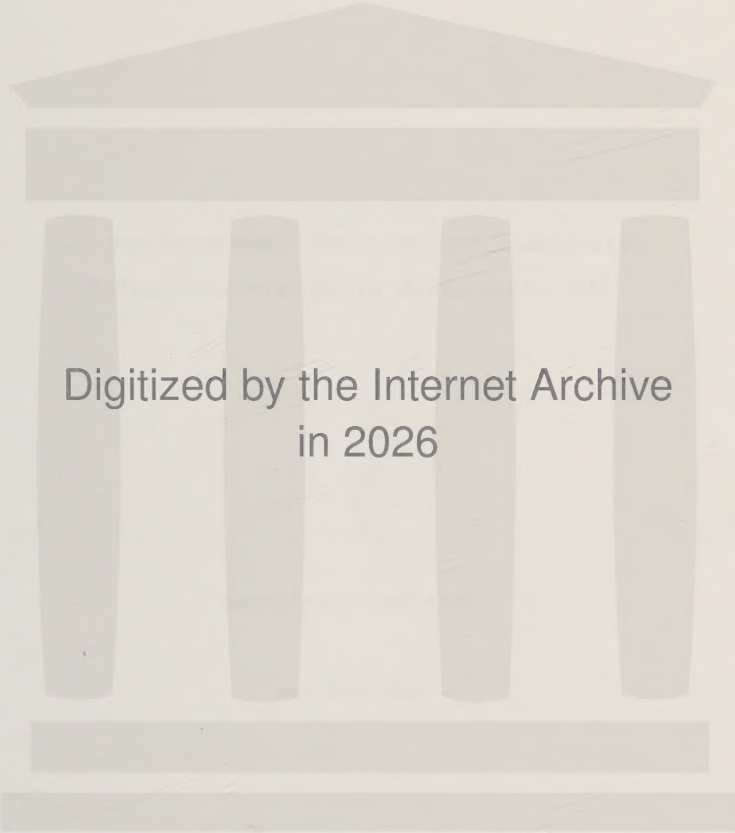


**Gen und Genprodukt
für eine rpoB unabhängige
Rifampicinresistenz
in Escherichia coli**

Bernhard Skrobranek

Disbui. München

1988



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554801_0049

Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Gen und Genprodukt für eine *rpoB* unabhängige
Rifampicinresistenz in *Escherichia coli*

von

Bernhard Skrobranek

aus München

1988

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von 12 (3) der Promotionsordnung vom 5. 3. 1981 von Prof. Dr. G. R. Hartmann betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

München, am 5. 9. 1988



Bernhard Skrobranek

Die Arbeit wurde eingereicht am 5. 9. 1988

1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. R. Hartmann
2. Berichterstatter: Prof. Dr. E.-L. Winnacker

Tag der mündlichen Prüfung: 23. 9. 1988

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 1985 bis September 1988 auf Anregung und unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. G. R. Hartmann am Institut für Biochemie der Ludwig-Maximilians-Universität München angefertigt.

Besonderen Dank schulde ich Herrn Prof. Dr. G. R. Hartmann, der mit großem Engagement und Interesse den Fortgang dieser Arbeit unterstützte.

Bedanken möchte ich mich weiterhin bei Herrn Dr. Adelman-Grill in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. K. Kühn, Max-Planck-Institut für Biochemie Martinsried, für seine wertvolle Hilfestellung bei der Immunisierung von Kaninchen.

Ebenso danke ich Herrn Dr. R. Mertz und Prof. Dr. E.-L. Winnacker, Genzentrum der Ludwig-Maximilians-Universität München, für die Synthese des Oligopeptids.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. P. Heinrich, Consortium für elektrochemische Industrie GmbH München, dessen Rat und Diskussionsbeiträge mir sehr geholfen haben.

Nicht zuletzt danke ich allen nicht namentlich genannten Kolleginnen und Kollegen, die meine Arbeit - auf welche Weise auch immer - unterstützt haben.

Meinen Eltern

Nullum magnum ingenium sine mixtura dementiae fuit.

Seneca "De tranquillitate animi" 17,10

INHALTSVERZEICHNIS

Einleitung.....	1
Problemstellung.....	4
Material und Methoden.....	5
Material.....	5
Bakterienstämme.....	5
Plasmide, Nukleinsäuren und Nukleotide.....	5
Enzyme.....	6
Chemikalien, Nährmedien und andere Materialien.....	6
Geräte.....	9
Methoden.....	11
Molekularbiologische Methoden.....	11
Bakterienzüchtung.....	11
Submerskulturen.....	11
Züchtung auf Agarplatten.....	12
Züchtung von JM105 Bakterien.....	12
Herstellung transformationskompetenter Zellen.....	13
Transformation von Bakterien.....	14
Aufbewahrung von Bakterienstämmen.....	14

DNA-Isolierungen.....	15
Plasmidanreicherung über CsCl-Dichtegradienten-	
zentrifugation.....	15
Plasmidanreicherung über HPLC.....	16
Schnellverfahren zur Plasmidisolierung.....	17
Isolierung von DNA aus Agarosegelen.....	18
Isolierung über DEAE-Cellulose-Membranfilter.....	18
Isolierung über Elektroelution.....	19
Isolierung aus niedrig schmelzender Agarose.....	20
Enzymatische Reaktionen an DNA.....	20
Hydrolyse mit Restriktionsenzymen.....	20
Entfernung des 5'-Phosphatrestes von DNA.....	22
Beseitigung überhängender Enden mit T4 DNA-Polymerase.....	22
Verknüpfung von DNA-Fragmenten durch T4 DNA Ligase...	23
Nick-Translation.....	24
Sequenzierung von DNA nach dem Didesoxyketten-	
abbruchverfahren.....	25
Hybridisierung von DNA/RNA (Northern Blot).....	27
Proteinchemische Methoden.....	29
Expression von Proteinen.....	29
T7 Expressionssystem.....	29
Expression in JM83.....	31
Gewinnung von Antiserum.....	33
Peptidsynthese.....	33
Kopplung des Peptids an einen Carrier.....	33
Immunisierung.....	35
Isolierung von Serum.....	35

Test auf erfolgreiche Immunisierung.....	36
Ouchterlony-Test.....	36
ELISA-Test.....	37
Inhibierung des ELISA-Tests.....	42
Ausbluten der Kaninchen.....	44
Reinigung des Serums.....	46
Kovalente Kopplung des Antigens an Epoxy-aktivierte Sepharose.....	46
Chromatographie.....	47
Immunpräzipitation.....	51
Western Blot.....	52
Membrantrennung.....	55
Proteinreinigung mit Ionenaustauscher.....	56
Herstellung von Zellextrakten.....	57
Chloroformextraktion.....	58
SDS-Proteingelelektrophorese.....	58
Ergebnisse.....	60
Rekombination von 3d ^{rif} aus Wildtyp- und Mutanten- fragmenten.....	63
Orientierung von 3d ^{rif} in pUC8.....	63
AccI Hydrolyse von 3d ^{rif}	64
Partielle AccI-Hydrolyse des WT- α Fragmentes.....	64
Ligation und Transformation.....	66
Resistenzverhalten des rekombinanten Klones.....	66
Einfluß von Leserahmen I auf die Resistenz.....	68



Abhängigkeit der Resistenz von Mutationen am 3d ^{rif}	
Fragment.....	70
Deletion von 362 bp am 5'Ende.....	70
Deletion von 695 bp am 5'Ende.....	72
Deletion von 61 bp am 3'Ende.....	74
Einführung eines Stop-Codons in Leserahmen I Ib.....	76
Wachstumsverhalten der 5'- und 3'-Mutanten.....	79
Versuche im T7-Expressionssystem.....	82
Klonierung von 3d ^{rif} in pT7-4.....	84
Expression des klonierten 3d ^{rif} -Fragmentes.....	86
Immunopräzipitation des 42 K Proteins.....	89
Immunochemischer Nachweis des 42 K Proteins im Gel.....	94
Expression des 1783 bp <i>AccI</i> / <i>Bam</i> HI Fragmentes.....	97
Expression des 1450 bzw. 647 bp <i>Dra</i> I/ <i>Bam</i> HI Fragments..	100
Expressionsversuche in verschiedenen Vektoren.....	100
Expression in pUC8.....	103
Expression in pKK223-3.....	105
Expression in pJF118u.....	110
Einfluß des Wirtsstammes auf die Induktion.....	110
RNA-Analyse.....	112
Proteinanreicherung mit Ionenaustauschern.....	116
Lokalisation des Genproduktes.....	121
Funktion des Genproduktes.....	124
Untersuchungen zur Dominanz der Mutation.....	126
Diskussion.....	128

Zusammenfassung.....	140
Anhang.....	141
Literatur.....	154
Lebenslauf.....	166
Abkürzungsverzeichnis.....	167

Verzeichnis der Figuren und Tabellen

	Seite
Fig. 1: Analyse der Reinheit des synthetisierten Peptids.....	32
Fig. 2: Antikörper-Titerbestimmung in Kaninchensera mit Hilfe eines ELISA-Tests bei geringer Verdünnung.....	40
Fig. 3: Antikörper-Titerbestimmung in Kaninchensera mit Hilfe eines ELISA-Tests bei hoher Verdünnung.....	41
Fig. 4: Hemmung der Antikörperbestimmung durch das zur Immunisierung verwendete Oligopeptid.....	43
Fig. 5: ELISA-Test der Sera der ausgebluteten Kaninchen.....	45
Fig. 6: Elutionsprofil der Immunoaffinitätssäule.....	49
Fig. 7: Densitometrische Auswertung eines "Western Blots" unter Verwendung der beiden durch Immunoaffinitäts- chromatographie gewonnenen Antikörperfraktionen.....	50
Fig. 8: Zwei Möglichkeiten zur Entwicklung von "Western Blots".....	53
Fig. 9: Restriktionskarte des WT- α Fragmentes nach Heinrich (1987).....	61
Fig. 10: Klonierungsstrategie zur Gewinnung eines aus Wildtyp- und Mutantenanteilen bestehenden Fragmentes.....	62
Fig. 11: Restriktionsanalyse von pUC8-3d ^{rif} , -WT- α und pBS1....	65
Fig. 12: Restriktionsanalysen zur Gewinnung und zum Klonierungs- nachweis des 1783 bp <i>AccI</i> / <i>BamHI</i> Fragmentes.....	71
Fig. 13: <i>BamHI</i> / <i>EcoRI</i> Hydrolyse von pUC12 mit insertiertem 1450 bp <i>DraI</i> / <i>BamHI</i> Fragment.....	73
Fig. 14: <i>ClaI</i> Hydrolyse von 3d ^{rif}	75
Fig. 15: Mutation in der <i>BstEII</i> Stelle.....	77
Fig. 16: Ausschnitt aus einer Gelchromatographie zur Sequenzanalyse der mutierten <i>BstEII</i> Stelle.....	78
Fig. 17: Wachstumsversuche mit den erzeugten Mutanten.....	80
Fig. 18: Abhängigkeit des Wachstums von der Rifampicin- konzentration.....	81
Fig. 19: Plasmid pGP1-2.....	83
Fig. 20: Plasmid pT7-3.....	83

Fig. 21: Expression des 3d ^{rlf} Gens im T7-System.....	87
Fig. 22: Hydrophilizitätsdiagramm des Proteins IIb.....	90
Fig. 23: Immunopräzipitation des mit 3d ^{rlf} im T7-System erhaltenen Genproduktes gefolgt von einer gelelektrophoretischen Auftrennung.....	93
Fig. 24: Western Blot einer T7-Expression.....	96
Fig. 25: Identifizierung des klonierten 1783 bp <i>AccI/BamHI</i> Fragmentes.....	98
Fig. 26: Densitometrische Auswertung der gelelektrophoretischen Analyse der Expression des 1783 bp <i>AccI/BamHI</i> Fragmentes mit Hilfe des T7-Systems.....	99
Fig. 27: Densitometrische Auswertung der gelelektrophoretischen Analyse der Expressionsversuche mit den voneinander getrennten Leserahmen I und IIb.....	101
Fig. 28: Gelelektrophoretische Analyse von Expressionsversuchen in das Plasmid pUC8 klonierter Gene Fig. 30: <i>tac</i> -Promotor-Bereich.....	104
Fig. 29: <i>tac</i> -Expressionsvektor pKK223-3.....	106
Fig. 30: <i>tac</i> -Promotor-Bereich.....	106
Fig. 31: Gelelektrophoretische Analyse von Expressionsversuchen mit dem Plasmid pKK223-3.....	108
Fig. 32: Autoradiogramm von Expressionsversuchen mit pKK223-3.....	109
Fig. 33: Expressionsvektor pJF118u.....	111
Fig. 34: Auftrennung von RNA aus JM105 Stämmen, die den Vektor pKK223-3 mit bzw. ohne dem klonierten 3d ^{rlf} Fragment enthalten	114
Fig. 35: Densitometrische Auswertung des Northern Blots mit den in Fig. 34 aufgetrennten Ribonukleinsäuren gegen das nick-translatierte 2145 bp <i>BamHI</i> Fragment.....	115
Fig. 36: Western Blot von Proteinfraktionen vor und nach Behandlung mit verschiedenen Ionenaustauschern.....	119
Fig. 37: Desitometrisch ausgewerteter Western Blot einer über Q-Sepharose FF gereinigter Proteinfraktion aus JM83 pUC8-3d ^{rlf}	120
Fig. 38: Densitometrisch ausgewertete Membrananalyse Rifampicin-resistenter und sensitiver Bakterienstämme.....	123
Fig. 39: Analyse des Rifampicin- bzw. Rifampicinderivatgehaltes in Zellextrakten resistenter und sensitiver Bakterienstämme.....	125
Fig. 40: RNA-Sekundärstruktur im Bereich der S.D.-Sequenz.....	130

Tab.1: Wachstumsvergleich des Wildtypstammes mit verschiedenen mutierten Stämmen.....	67
Tab.2: Beeinflussung des Wachstumsverhaltens durch Expression des kleinen Leserahmens I.....	69
Tab.3: Abhängigkeit der Expression vom verwendeten Wirtsstamm.....	111

EINLEITUNG

Bei der Bekämpfung bakteriell verursachter Infektionen haben Antibiotika immense Bedeutung erlangt. Leider hat immer höherer Verbrauch an Antibiotika auch zunehmende Resistenz vor allem gram-negativer Bakterien zur Folge, was in Kliniken zum Erscheinungsbild des sog. Hospitalismus' führte (Nikaido und Vaara 1985). Als Folge davon ist die Forschung gezwungen, immer neue Antibiotika zu charakterisieren, gegen die über kurz oder lang mit Sicherheit ebenfalls eine zunehmende Resistenz beobachtet werden kann. Daher gewinnen Untersuchungen über die Entstehung und molekulare Ursache von Resistenzen wachsende Bedeutung. So beruht z. B. die bakterizide Wirkung von Chloramphenicol (wirkt auf Translationsebene durch Inhibierung der ribosomalen Peptidyltransferase, Gale *et al.* 1981) auf einer induzierbaren Acetylierung des Wirkstoffes durch Chloramphenicolacetyltransferase. Resistenz gegenüber Penicillinen, die die Biosynthese bakterieller Zellwände inhibieren, hat ihre Ursache in einer Spaltung des β -Lactam-Ringes durch das Enzym β -Lactamase (entweder plasmidkodiert oder durch Transkriptionsattenuation des chromosomalen Genes in *E. coli* induziert, Jaurin *et al.* 1981). Eine weitere Möglichkeit zur Erlangung von Resistenz ist durch Veränderung der Permeationseigenschaften denkbar. So sind Fälle für allerdings hydrophile Inhibitoren wie β -Lactam-Antibiotika und Tetracyclin beschrieben, gegen welche durch Mutation der in der äußeren Membran gram-negativer Bakterien lokalisierten Porine ein Eindringen der Wirkstoffe blockiert wird (Wehrli 1983, Harder *et al.* 1981).

Das Breitbandantibiotikum Rifampicin findet schon seit langem Anwendung als biogenes Arzneimittel bei der Bekämpfung des *Mycobacterium tuberculosis*. Rifampicin ist ein halbsynthetisches 3-(4-methyl-piperazinyl-iminomethyl)-Derivat von Rifamycin SV, welches als eines von vielen Rifamycinen von dem gram-positiven Bakterium *Nocardia mediterranei* ausgeschieden wird (Maggi *et al.* 1966). Durch Untersuchungen an *E. coli* konnten Hartmann *et al.* 1967 als Wirkort die RNA-Polymerase bestimmen, an deren β -Untereinheit (im Polypeptid-Komplex) das Anti-biotikum bindet und somit die Elongation der naszierenden RNA-Kette zu inhibieren vermag (Wehrli 1983, Hartmann *et al.* 1985).

Zur Aufklärung des Permeationsmechanismus' für Rifampicin erschien die Isolierung von Mutanten vielversprechend, deren RNA-Polymerase weiterhin sensitiv für das Antibiotikum war. So gewann Tropschug 1980 durch Mutagenese von *E. coli* K-12 mit Nitrosoguanidin und anschließender Selektion auf Rifampicin-Resistenz Bakterienstämme, für die er 1981 eine Reduzierung der Rifampicinaufnahme nachwies. Weitere Rifampicin-resistente Mutanten konnte Kollenda 1985 sowohl durch Insertion des Bakteriophagen Mu erhalten, deren Mutationen ebenfalls nicht das *rpoB*-Gen betreffen und durch Pl-Transduktion übertragbar sind. Aus einer der von Tropschug gewonnenen Mutanten isolierte Heinrich 1987 einen DNA-Abschnitt, der, kloniert in Plasmidvektoren, nach Transformation in *E. coli* in der Lage war, Resistenz gegen Rifampicin zu induzieren. Die Sequenzierung und Computeranalyse dieses Abschnittes ergab zwei offene Leserahmen, deren Produkte für die Resistenz verantwortlich sein könnten (Fig. 9). Auf Grund des von Tropschug postulierten Defektes der Mutanten in der Rifampicinaufnahme untersuchte Kollenda die Membranen dieser Stämme und konnte einige Unterschiede in ihrer Zusammensetzung nachweisen.

Ebenfalls von Kollenda durchgeführte *in vivo* (in Minizellen) und *in vitro* (mit Zubay-Extrakten) Genexpressionsversuche zeigten ein Protein der relativen Molekularmasse von etwa 58 K, was allerdings in Widerspruch zu den relativen Molekularmassen der hypothetischen Proteine (etwa 48 bzw. 11 K) steht, welche aus der Sequenz des Genfragmentes gefolgert werden können. Die Aminosäuresequenz dieser Proteine läßt auf einen sehr stark hydrophoben Charakter schließen, weshalb eine Lokalisation in der Zellmembran durchaus postuliert werden kann. Auch das Fehlen von Sequenzen, die als für Membranproteine typisches Signalpeptid angesehen werden können (Heinrich 1987), spricht nicht unbedingt gegen diese Hypothese, da auch andere, vornehmlich in der Cytoplasmamembran von gram-negativen Bakterien lokalisierte Proteine bekannt sind, die keinerlei Signalsequenzen besitzen. Selbst Proteine, welche die innere Membran ohne Signalpeptid permeieren müssen, um an ihren funktionellen Ort zu gelangen, sind bekannt. Als Beispiel hierfür kann man das Produkt des *traJ* Genes des F-Plasmid Operons (Fowler *et al.* 1983) und die Hydrogenase aus *Desulfovibrio vulgaris* (Voordrouw und Brenner 1985) anführen. Ebenso beschrieben sind Proteine, deren topogene Regionen innerhalb des gereiften Proteins liegen wie z. B. bei einem *lamB-lacZ* Fusionsprotein, für dessen korrekte Lokalisation die Aminosäuren 43-49 essentiell sind (Benson *et al.* 1984).

Problemstellung

Die seit Heinrich 1987 bestehende Möglichkeit, *rpoB*-unabhängige Rifampicinresistenz bei *E. coli* durch Transformation mit einem isolierten und klonierten DNA Fragment aus Mutanten zu erzeugen, eröffnet zahlreiche Möglichkeiten einer genaueren Untersuchung dieses Phänomens.

So sollte herausgefunden werden, ob die Resistenzinduktion durch Transformation sich auf lediglich einen der beiden auf dem Genfragment existierenden offenen Leserahmen zurückführen läßt oder ob beide für diesen Effekt benötigt werden.

Da Heinrich 1987 zwei Mutationen gegenüber dem entsprechenden Wildtypgen fand, lag es nahe zu testen, welche der beiden verantwortlich für das Resistenzphänomen ist.

Mutationen in verschiedenen Bereichen des Genfragmentes und anschließende Wachstumsversuche mit diesen Mutanten sollten Aussagen über die Frage erlauben, welche Abschnitte des Fragmentes essentiell für die Resistenzproduktion sind.

Die Frage nach der Existenz der auf dem Gen kodierten Proteine *in vivo* sollte in Expressionsversuchen mit speziellen Vektoren nachgegangen werden, wobei versucht werden sollte, die Empfindlichkeit des Proteinnachweises durch immunologische Methoden zu steigern.

Durch Verwendung spezifischer Immunglobuline sollte auch eine Lokalisation der Genprodukte in der Bakterienzelle möglich sein.

Außerdem wurde versucht, durch Analyse der Rifampicinderivate sowohl in ganzen Zellen als auch in Zellextrakten zu Aussagen über die mögliche Funktion der Genprodukte zu gelangen.

MATERIAL

Bakterienstämme

Aus der Stammsammlung des Arbeitskreises Prof. Hartmann waren: Rifampicinaufnahmemutante *E. coli* 10/1t, JM83 (Vieira und Messing 1982), JM103 (Messing *et al.* 1981), MM294 (Bachmann 1987) und HB101 (Boyer und Roulland-Dussoix 1969) von Pharmacia, Freiburg wurde bezogen: JM105 (Yanisch-Perron *et al.* 1985)

Plasmide, Nukleinsäuren und Nukleotide

Die Plasmide pUC8, pUC12 (Vieira und Messing 1982) und pUC19 (Yanisch-Perron *et al.* 1985) waren aus der Sammlung des Arbeitskreises.

Das Plasmid pKK223-3 wurde von Pharmacia, Freiburg bezogen. pJF118u (nicht veröffentlicht) war ein Geschenk von Lanka, Berlin.

Die Plasmide pGP1-2 und pT7-3 (-4) stellte mir Herr W. Weiss in unserem Arbeitskreis zur Verfügung.

Das 3drif-Fragment und das entsprechende WT- α Fragment stellte mir Herr Dr. Peter Heinrich zur Verfügung ebenso wie den 17mer reversen pUC sequencing Primer (Heinrich 1986).

Die Nukleotide lieferten:

Amersham Buchler, Braunschweig: [α - 35 S]thiodATP (650 Ci/mMol)
[α - 32 P]dCTP (3000 Ci/mMol)

Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim: dATP, dCTP, dTTP, dGTP
ddATP, ddCTP, ddTTP, ddGTP
ATP

Enzyme

Die verwendeten Restriktionsenzyme wurden von den Firmen Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim; Pharmacia, Freiburg; New England Biolabs, Schwalbach und P-L Biochemicals, Milwaukee, USA bezogen.

Weitere Enzyme lieferten:

Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim:

T4 DNA Ligase, Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm, Lysozym, Ribonuklease A, T4 DNA Polymerase, DNA Polymerase I (Kornberg Enzym), Klenow-Fragment der DNA Polymerase I, Desoxyribonuklease I

Pharmacia, Freiburg: T4 DNA ligase

Chemikalien, Nährmedien und andere Materialien

Aldrich-Chemie, Steinheim:

Natriumrhodanid

Amersham Buchler, Braunschweig:

biotinylierte Anti-Kaninchen Immunglobuline vom Esel, biotinylierter Streptavidin Peroxidase Komplex, [^{125}J]Protein A

Behringwerke AG, Marburg:

Komplettes Freund'sches Adjuvans

Bender und Hobein, München:

Whatman 3MM Papier, Whatman GF/C Filter 2.5 cm

Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim:

Chloramphenicol, Dithiothreitol (DTT), Ethidiumbromid,
Isopropyl- β -D-thio-galactopyranosid (IPTG), Kanamycin,
Rifampicin, Rinderserumalbumin (BSA) Fraktion V, Tris-
(hydroxymethyl)-aminomethan

Diagen, Düsseldorf:

Nucleogen DEAE-4000 HPLC-Säule

Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA:

Bacto-Agar, Bacto-Trypton, Bacto-Yeast-Extract
(bezogen über Otto Nordwald KG, Hamburg)

GFL, Bergwedel:

Schüttelwasserbad 1083

Glücksklee, Hamburg:

Magermilchpulver (bezogen über Krone, München)

Janssen Chimica, Beerse, Belgien:

Aminoacetonitrilhemisulfat

E. Merck AG, Darmstadt:

Ammoniumacetat, Ammoniumperoxodisulfat (PER), Borsäure,
 Bromphenolblau, 1-Butanol, 2-Butanol, Chloroform,
 Dimethylformamid, Eisen(III)chlorid, Essigsäure, Ethanol,
 Ethanolamin, Formamid, Glucose, Glycerin, Harnstoff,
 Isoamylalkohol, Kaliumacetat, Kaliumdihydrogenphosphat,
 Kaliumhydrogenphosphat, Calciumchlorid, Magnesiumacetat,
 Magnesiumchlorid, Magnesiumsulfat, Methanol, Natriumacetat,
 Natriumazid, Natriumcarbonat, Natriumchlorid, Natriumcitrat,
 Natriumdihydrogenphosphat, Natriumhydrogenphosphat,
 Natriumhydroxid, Ninhydrin Spray, Perhydrol, Phenol, 2-
 Propanol, Saccharose, Silica Gel 60F DC-Platten

Microgon Inc., Laguna Hills CA, USA:

Dynagard 0.2 μm Sterilfilter
 (bezogen über Tecnomara, Fernwald)

Pharmacia, Freiburg:

Epoxyaktivierte Sepharose 6B, Ficoll 400, Sephadex G-25,
 Sephadex G-50 fine, Q-Sepharose FF, S-Sepharose FF

Photo Schaja, München:

Polaroid Film 107, Kodak Röntgenfilme X-Omat AR,
 Fuji Röntgenfilme RX-100

Riedel-de Haen AG, Seelze:

Methanol, Essigsäure

Rühl Chemie, Friedrichshafen:

Cäsiumchlorid

Sartorius GmbH, Göttingen:

Minisart NML 0.45 μm , 0.2 μm Sterilfilter

Serva, Heidelberg:

Acrylamid, Borsäure, Coomassie Brilliant Blue G 250,
Dialysesschläuche, Ethanol, Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA),
Harnstoff, N,N'-Methylenbisacrylamid, Natriumdodecylsulfat
(SDS), Phenylmethylsulfonylfluorid, N,N,N',N'-
Tetramethylethylendiamin (TEMED), Triton X-100, 2-Xylencyanol
FF

Schleicher und Schüll, Dassel:

DEAE-Cellulosemembran NA-45, Nitrocellulosefilter BA-85

Sigma Chemie, München:

Agarose Typ I, Agarose Typ II, Ampicillin, 5-Brom-4-chlor-3-
indoyl- β -D-galactosid (X-Gal), Cäsiumchlorid, 3,3-
Diaminobenzidin, Dimethyldichlorsilan, Ethidiumbromid, -
(Methacryloxy)-propyltrimethyloxysilan, Nonidet P-40,
Streptomycin

Geräte

Bachhofer, Reutlingen:

Speed Vac Concentrator SVC-100H

Beckman Instruments GmbH, München:

Ultrazentrifugen L5-65 und L8-70; Microgenie, sequence software

Biometra, Göttingen:

Blotting Apparatur

Branson Sonic Power Company, Schwäbisch Gmünd:

Sonifier B12

Desaga, Heidelberg:

MinUVIS UV-Lampe

Gilford, Oberlin Ohio, USA:

Spectrophotometer 260

Heraeus-Christ, Osterode:

Labofuge II

Hirschmann, München:

elscript 400 Densitometer

Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA:

Slab Gel Dryer SE 1140

Pharmacia LKB, Freiburg:

LKB HPLC Anlage: Controller 2152, Pumpe 2150, Uvicord SD 2156

LKB Macrophor Sequencing System

Sigma, Taufkirchen:

Sigma 2MK kühlbare Tischzentrifuge

Sorvall Instruments, Bad Nauheim:

Zentrifugen RC-5 und RC-5C

METHODEN

Molekularbiologische Methoden

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle molekularbiologischen Methoden in Anlehnung an Heinrich (1987) durchgeführt.

Bakterienzüchtung

Submerskulturen

Normalerweise diente als Nährstoffquelle für Bakterien Luria-Broth (LB)-Medium (5 g Hefeextrakt, 10 g Bactotrypton, 5 g NaCl pro Liter). Zur Aufzucht von Bakterien wurde steriles LB-Medium bei Bedarf mit einer sterilen Antibiotikumlösung (Ampicillin- bzw. Kanamycinstammlösung: 25 mg/ml; Konzentration im Medium: 50-100 µg/ml) versetzt. Nach Inokulation von meist 500 ml Medium mit 25 ml einer Übernachtskultur wurden die Bakterien bei 37°C unter Schütteln so lange inkubiert, bis die optische Dichte bei 600 nm einen Wert von etwa 0.8 erreicht hatte. Sollte Plasmid-DNA aus den gezüchteten Bakterien angereichert werden, wurde die Kultur mit 2.5 ml einer Chloramphenicolstammlösung (34 mg/ml in Ethanol) pro Liter Medium zur Stimulation der Plasmidsyntheserate versetzt und maximal 16 h weiter inkubiert. Durch Zentrifugation im Sorvall GS3-Rotor (7000 Upm, 10 min, 4°C) wurden die Bakterien geerntet und anschließend bei -20°C eingefroren, wenn eine sofortige Weiterverarbeitung nicht möglich war.

Züchtung auf Agarplatten

Für Agarplatten wurde LB-Medium mit 15 g Agar pro Liter autoklaviert und nach Abkühlung auf etwa 50-60°C bei Bedarf mit Antibiotika (Konzentration wie bei Submerskulturen) versetzt. Diese Lösung wurde in sterile Petrischalen (Durchmesser 90 bzw. 145 mm) gegossen, die Oberfläche der Platten zur Eliminierung von Luftblasen abgeflammt und dann an der Luft getrocknet. Die maximale Aufbewahrungszeit betrug 3 Wochen bei 4°C unter Lichtausschluß. Zum Hochziehen von Glycerinkulturen wurden Bakterien mit einer sterilen Impföse auf den Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C bebrütet.

Züchtung von JM105 Bakterien

Hier war die Vorgehensweise ebenso wie oben beschrieben. Lediglich wurde statt LB-Medium ein M9 Medium verwendet, in welchem ein Verlust des F'Episoms mit weit geringerer Häufigkeit eintritt.

M9-Medium: 6.0 g Na_2HPO_4

3.0 g KH_2PO_4

0.5 g NaCl

1.0 g NH_4Cl

in 800 ml Wasser lösen und pH auf 7.4 einstellen

ad 1 l mit H_2O auffüllen und autoklavieren

Dazu wurden vor Gebrauch pro Liter

2 ml 1 M MgSO_4

10 ml 20 % Glucose

100 μl 1 M CaCl_2

100 μl Thiamin-Lösung (10 mg/ml)

2.5 ml Streptomycin-Lösung (20 mg/ml)

jeweils steril filtriert zugegeben.

Herstellung transformationskompetenter Zellen

20 ml LB-Medium wurden als 1:20 Verdünnung mit einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD₅₅₀ von 0.5 bebrütet. Nach Abkühlen der Kultur auf Eis wurde sie in vorgekühlten, autoklavierten SS34-Bechern 5 min bei 7000 Upm und 4°C zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 10 ml 50 mM CaCl₂, 10 mM Tris pH 8.0 (vorgekühlt) aufgenommen, vorsichtig vermischt und 15 min bei 0°C stehen gelassen. Nach Zentrifugation der Suspension (7000 Upm, 5 min, 4°C) wurde der Niederschlag in 2 ml 50 mM CaCl₂, 10 mM Tris pH 8.0, 15% Glycerin (vorgekühlt) aufgenommen und in Aliquots à 200 µl aufgeteilt. Die so behandelten Zellen waren nach 5 h Standzeit auf Eis verwendungsfähig oder wurden für späteren Gebrauch sofort im Trockeneis/Methanol-Bad schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt. Die Transformationseffizienz eingefrorener kompetenter Zellen war allerdings eine Zehnerpotenz geringer als die von frischen Bakterien (etwa 10⁶ rekombinante Klone pro µg transformierter DNA).

Transformation von Bakterien

Zur Transformation wurden sowohl frische als auch tiefgefrorene, auf Eis wieder aufgetaute kompetente Zellen verwendet. Etwa 40-50 ng (entsprach meistens der Hälfte eines Ligase-Ansatzes) der zu transformierenden Plasmid-DNA wurden in 100 μ l TE-Puffer (10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0) aufgenommen und zu den Zellen gegeben. Nun folgte eine 30minütige Inkubation auf Eis, an die sich ein Hitzeschock bei 42°C für 2 min anschloß. 1 ml eines auf 37°C vorgewärmten LB-Mediums wurde zum Transformationsansatz gegeben und für eine weitere Stunde bei 37°C geschüttelt. Zur Selektion auf transformierte Bakterien wurde ein Aliquot von 200 μ l des Ansatzes auf Agarplatten ausgestrichen, die ein zur Selektion geeignetes Antibiotikum enthielten. Sollten pUC-Plasmide ausplattiert werden, konnte durch Zugabe von 40 μ l einer X-Gal-Lösung (20 mg/ml in DMF) pro Platte eine Blaufärbung von Kolonien erreicht werden, die kein rekombinantes Plasmid aufgenommen hatten, sondern lediglich rezirkularisierten Vektor.

Aufbewahrung von Bakterienstämmen

Bakterienstämme wurden entweder als Glycerinkultur in 40% Glycerin bei -20 bzw. -80°C für längere Zeit oder für maximal ein Monat auf Agarplatten bei 4°C aufbewahrt.

DNA-Isolierungen

Plasmidanreicherung über CsCl-Dichtegradientenzentrifugation

Bakterien einer 500 ml Submerskultur, deren Plasmidsynthese durch Chloramphenicol stimuliert war, wurden nach Zentrifugation in 6 ml 25%iger Sucrose-Lösung (in 0.05 M Tris pH 8.0) bei 4°C aufgenommen und nach Zugabe von 1 ml frischer kalter Lysozym-Lösung (5 mg/ml, 0.25 M Tris pH 8.0) 10 min bei 4°C stehen gelassen. Nach Addition von 2 ml 250 mM Na₂EDTA (pH 8.0) wurde die Inkubationszeit um weitere 10 min verlängert. Nun erfolgte die Zugabe von 8 ml Lysis-Mix (0.2% Triton X-100, 50 mM Tris pH 8.0, 62.5 mM Na₂EDTA pH 8.0). Nach 10 min wurde die stark viskose Lösung im Sorvall SS34 Rotor bei 4°C, 20000 Upm für 60 min zentrifugiert und das klare Lysat gesammelt. Pro ml Lysatvolumen wurde 1 g CsCl zugegeben und anschließend pro 10 ml dieser Lösung 800 µl einer Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) hinzugefügt. Nach Abfüllen dieser Mischung in Beckman Polyallomer Quick Seal Tubes und Verschweissen dieser Behälter wurden sie bei 47000 Upm, 18°C für 18 h im VTi65 Rotor ultrazentrifugiert (ebenso möglich war eine Zentrifugation bei 65000 Upm, 18°C, 4 h). Die in langwelligem UV-Licht (366 nm) nun fluoreszierende Plasmidbande etwa in der Mitte des Röhrchens wurde durch Ablassen des Gradienten nach unten in einem Reagenzglas aufgefangen und zur Entfernung von Ethidiumbromid 5mal mit dem gleichen Volumen an H₂O gesättigtem Butanol extrahiert. Zur Entfernung von CsCl erfolgte eine Dialyse gegen insgesamt 5 l TE-Puffer (10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0). Die Konzentration der so erhaltenen gereinigten Plasmidlösung wurde durch Aufnahme eines Absorptionsspektrums im Bereich von 230-280 nm bestimmt und die Reinheit auf einem Agarose-Gel überprüft.

Plasmidanreicherung über HPLC

Die Anwendung von HPLC zur Plasmidreinigung und Fragment-isolierung ist bei Müller (1986a, 1986b) sowie bei Westman *et al.* (1987) gut beschrieben.

Die Lyse der plasmidhaltigen Bakterien wurde genauso durchgeführt wie oben geschildert. Zur Vorbereitung der Reinigung wurde die mit RNase vorbehandelte, phenolisierte und mit Ethanol präzipitierte Probe in soviel TE-Puffer (10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA) gelöst, wie für eine Plasmidkonzentration von etwa 0.5 mg/ml nötig war. Die Chromatographie wurde an einer Nucleogen DEAE 4000 Säule der Firma Diagen durchgeführt, die zu Beginn mit den Puffern A und B gut gespült und anschließend mit Puffer A equilibriert worden war. Die aufzutragende Probe (das Volumen variierte zwischen 50-200 µl) wurde nach Zugabe des gleichen Volumens Puffer A auf die Säule mit einer Spritze aufgetragen und mit einem Gradienten (10-100 % Puffer B in 40 min, Durchflußgeschwindigkeit: 1 ml/min) eluiert. Bei etwa 1 M NaCl erschien das Plasmid als scharfer Gipfel, der zur Konzentrierung des Nukleinsäuregehaltes mit Ethanol präzipitiert wurde.

Puffer A: 0.5 M NaCl

5.0 M Harnstoff

30 mM K-Phosphat pH 6.5

Puffer B: 1.25 M NaCl

5.00 M Harnstoff

30 mM K-Phosphat pH 6.5

Schnellverfahren zur Plasmidisolierung

Zur Überprüfung erzeugter Transformanden wurden die zu testenden Klone in 5 ml Übernachtskulturen gezogen und nach erfolgtem Wachstum aus 2 ml durch einminütige Zentrifugation in der Eppendorffzentrifuge die Bakterien gewonnen. Das noch Verunreinigungen an Medium enthaltende Pellet mußte deshalb mit Wasser Medium-frei gewaschen werden, bevor es in 100 µl Lysis-Mix, dem 4 mg/ml Lysozym kurz vor Gebrauch beigemischt worden waren, suspendiert wurde. Nach 5minütiger Inkubation bei Raumtemperatur konnte durch Zugabe von 200 µl einer frischen alkalischen Detergens-Lösung (0.2 M NaOH, 1% SDS) eine komplette Lysis der Bakterien erreicht werden. Gleich anschließend wurden 150 µl einer eiskalten 3 M Kaliumacetat-Lösung zugegeben und das Gemisch für 20 min bei 0°C inkubiert. Das ausgefallene SDS und zelluläre Protein wurde bei 13000 Upm und 4°C in der Sigma-Zentrifuge abgetrennt. Zum klaren Überstand kam das gleiche Volumen an Phenol, um noch enthaltene Proteine zu entfernen. Die wässrige Phase wurde noch 2 weitere Male mit Phenol extrahiert, bevor sich eine dreimalige Behandlung mit Phenol/Chloroform anschloß. Reste dieses Gemisches wurden aus der wässrigen Phase durch Ausschütteln mit Chloroform eliminiert. Die enthaltene Plasmid-DNA wurde nun durch Zugabe von 2.5 Volumenteilen absolutem Ethanol (-20°C) präzipitiert und durch Zentrifugation bei 4°C (40 min) isoliert. Das erhaltene Pellet konnte durch Waschen mit 70%igem Ethanol und nochmaliger Zentrifugation (4°C, 20 min) von Salzverunreinigungen befreit werden. Anschließend wurde es im Speedvac kurz getrocknet, in autoklaviertem Wasser gelöst und bei -20°C aufbewahrt.

Lysis-Mix: 50 mM Glucose
10 mM EDTA
25 mM Tris pH 8.0

Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Isolierung über DEAE-Cellulose-Membranfilter

DNA-Fragmente (etwa 1 - 3 µg) in einer Größe von 500 - 2000 bp lassen sich mit dieser von Winberg und Hammar skjöld (1980) entwickelten und bei Gaastra und Jorgensen (1984) gut beschriebenen Methode leicht aus einem Agarosegel isolieren. Nach Auftrennung des DNA-Gemisches wurden die mit Ethidiumbromid angefärbten Banden unter UV-Licht bei 366 nm sichtbar gemacht. Vor (in Laufrichtung) die zu isolierende Bande wurde mit dem Skalpell ein Schnitt in der Breite der Bande gesetzt, in den eine passend zugeschnittene DEAE-Cellulosemembran (NA-45, Schleicher und Schüll) so plazierte wurde, daß die Membran vollständig durch das Gel reichte. Für eine gute DNA-Bindung war es nötig, die zugeschnittenen Membranfilter vor der Verwendung 10 min mit 10 mM EDTA pH 7.6, 5 min mit 0.5 M NaCl und anschließend mehrmals mit Wasser zu waschen. So behandelt ließen sie sich bei 4°C einige Wochen in autoklaviertem Wasser lagern. Nach dem Einsetzen der Membranen ins Gel wurde die Elektrophorese so lange fortgesetzt, bis die gewünschte DNA vollkommen an das Filter gebunden hatte. Dies konnte unter UV-Licht (366 nm) verfolgt werden. Nach Herausziehen der Membran aus dem Gel wurden eventuell noch anhaftende Agarosestückchen mit NET-Puffer (0.15 M NaCl, 0.1 mM EDTA, 20 mM Tris pH 8.0) abgewaschen und das Filter auf die Größe der rot fluoreszierenden DNA-Bande zugeschnitten.

Durch 45minütiges Erhitzen des Filters auf 65°C in so viel Hochsalz-NET-Puffer (1 M NaCl, 0.1 mM EDTA, 20 mM Tris pH 8.0), wie zur vollkommenen Bedeckung des Membranstückchens nötig war, konnte die gebundene DNA freigesetzt werden. Das darin enthaltene Ethidiumbromid wurde mit wassergesättigtem 1-Butanol extrahiert und die DNA anschließend mit Ethanol präzipitiert.

Isolierung über Elektroelution

Sollten größere Mengen eines DNA-Fragmentes (10-30 µg) isoliert werden, war auf Grund der niedrigen Bindungskapazität eine Verwendung von DEAE-Cellulosefilter nicht günstig. Deshalb wurde das Verfahren der Elektroelution gewählt. Hierzu trennte man die DNA-Fragmente auf einem 5 mm dicken 0.8 %igem Agarosegel, das bei 4°C und 60 V über Nacht lief. In Laufrichtung vor die zu isolierende Bande (etwa 2-3 mm) wurde ein etwa 2 mm dicker Spalt in Bandenbreite geschnitten, durch den ein ausgekochter, passend zugeschnittener Dialyseschlauch so gezogen wurde, daß er den Spalt nach unten abdichtete und an der von der Bande entfernteren Wand anlag. Zu beachten ist dabei, daß der Laufpuffer die Oberfläche des Gels nicht bedeckt. Die dann durchgeführte weitere Auftrennung (30 min bei 200-300 V) führte zu einer Fixierung der DNA an den Dialyseschlauch. Durch kurzes Umpolen (1 min, 200-300 V) wurde eine Ablösung der DNA von dem Schlauch in den Spalt erreicht, aus dem sie mit einer Pipette abgesaugt werden konnte. Die so gewonnene DNA wurde mehrmals mit 1-Butanol zur Entfernung von Ethidiumbromid ausgeschüttelt und anschließend mit Ethanol präzipitiert.

Isolierung aus niedrig schmelzender Agarose

Alternativ zur Elektroelution wurde auch die bei Gaastra und Jorgensen (1984) beschriebene Methode der Isolierung aus einem niedrig schmelzenden Agarosegel angewandt. Dazu wurde ein 0.8%iges Agarosegel wie üblich vorbereitet, der einzige Unterschied bestand in der Verwendung von niedrig schmelzender Agarose (Sigma) statt der sonst benutzten. Die Trennung der Fragmente erfolgte bei 4°C und einer Spannung von 3 V/cm, um eine Überhitzung des Geles und somit Aufschmelzung zu vermeiden (Dauer ca. 20h). Die unter langwelligem UV-Licht sichtbare Bande wurde ausgeschnitten, in einem geeignetem Gefäß bei 65°C aufgeschmolzen und die darin enthaltene DNA durch dreimalige Extraktion der Agarose mit je einem halben Volumen Phenol (mit Tris pH 8.0 gesättigt) gereinigt. Auch hier wurde das Ethidiumbromid durch Ausschütteln mit 1-Butanol entfernt und das Fragment durch Ethanolpräzipitation gefällt.

Enzymatische Reaktionen an DNA

Hydrolyse mit Restriktionsenzymen

Zur hydrolytischen Spaltung wurde die DNA in einem Konzentrationsbereich von 5-200 µg eingesetzt. Die für das benutzte Restriktionsenzym nötige Salzkonzentration wurde in den meisten Fällen mit einem 10fach konzentrierten Stammpuffer nach Maniatis *et al.* (1982) eingestellt. Folgende Stammpuffer wurden verwendet:

	NaCl	Tris pH 7.5	MgCl ₂	DTT
Niedrigsalzpuffer :	0 mM	10 mM	10 mM	1 mM
Mittelsalzpuffer :	50 mM	10 mM	10 mM	1 mM
Hochsalzpuffer :	100 mM	50 mM	10 mM	1 mM
Superhochsalzpuffer :	150 mM	50 mM	10 mM	1 mM

Enzyme, deren Aktivitätsbedingungen stark von diesen Puffern differierten, wurden in speziellen Puffern nach Hersteller-vorschrift eingesetzt.

Alternativ dazu wurde auch das 5-Puffer-System von Boehringer, Mannheim benutzt.

Die Reaktionsdauer für vollständige Hydrolyse betrug 3-4 h bei 37°C, wenn vom Hersteller nicht anders angegeben. Dazu wurden pro 1 µg zu schneidender DNA 1-10 units des Restriktionsenzym gegeben. Beendet wurde die Hydrolyse entweder durch Phenolierung des Ansatzes oder durch Zugabe von 1/10 Volumenteilen Gelauftragspuffer folgender Zusammensetzung:

0.25 % Bromphenolblau

0.25 % Xylencyanol

0.1 M EDTA

20.0 % Ficoll 400

Entfernung des 5'-Phosphatrestes von DNA

Um die Recyclisierung geschnittener DNA zu unterbinden und somit bei Insertion von Fremd-DNA einen höheren Anteil an rekombinantem Vektor zu erhalten, wurde die dafür nötige 5'-Phosphatgruppe durch alkalische Phosphatase aus Kälberdarm abgespalten (Chaconas und van de Sande 1980). Dazu wurde die mit Ethanol präzipitierte DNA in 50 μ l Puffer (50 mM Tris pH 8.0, 0.1 mM EDTA) gelöst und mit alkalischer Phosphatase (1 U/ μ g DNA) versetzt. Die nachfolgende Inkubation bei 37°C für 30 min führte zur Freisetzung des 5'-Phosphates. Durch 45minütiges Erhitzen des Ansatzes auf 65°C konnte das Enzym anschließend inaktiviert werden bevor es durch Phenolisierung und Ethanol-fällung der DNA entfernt wurde.

Beseitigung überhängender Enden mit T4 DNA-Polymerase

Da T4 DNA-Polymerase neben ihrer 5'→3' Polymeraseaktivität auch eine 3'→5' Exonukleaseaktivität besitzt, die etwa 200mal höher ist als diejenige von Klenow-Polymerase, eignet sie sich sowohl für das Auffüllen überhängender 5'-Enden als auch für den Abbau überhängender 3'-Enden (O'Farrell 1981). In Klonierungsexperimenten können beide Reaktionen nötig sein, um die für "blunt-end"-Ligationen nötige DNA mit glatten Enden zu erhalten. Für die Reaktion wurden 0.5-2 μ g geschnittene und gefällte DNA in 16 μ l sterilem H₂O gelöst und mit 2 μ l 10x T4 Polymerase-Puffer versetzt. Nach Zugabe von 2 units T4 DNA-Polymerase wurde die Reaktion durch Addition von 1 μ l einer 2 mM Lösung der vier dNTP's gestartet. Inkubiert wurde für 30 min bei Raumtemperatur. Nach Stoppen der Reaktion durch 5minütiges Erhitzen auf 70°C wurde durch Phenolextraktion der Proteinanteil aus der DNA-Lösung entfernt und aus dieser die enthaltenen Nukleinsäuren mit Ethanol präzipitiert.

10x T4 Polymerase-Puffer: 0.33 M Tris-acetat pH 7.9
 0.66 M K-acetat
 0.10 M Mg(acetat)₂
 5.0 mM DTT
 1 mg/ml BSA

Verknüpfung von DNA-Fragmenten durch T4 DNA Ligase

Lineare DNA-Fragmente können durch T4 DNA Ligase kovalent verbunden werden. Dieses Enzym katalysiert die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen 3'-OH und 5'-Phosphat-Enden von DNA. Das für die Effizienz dieser Reaktion entscheidende molare Verhältnis von Vektor zu Insert wurde in den meisten Fällen nach Dugaiczky *et al.* 1975 berechnet. Die Gesamtkonzentration an eingesetzter DNA betrug nie mehr als 300 ng. Ein typischer Ligaseansatz war bei 20 µl Reaktionsvolumen von folgender Zusammensetzung:

1 µl Vektor
 1 µl Insert
 1 µl 10x Ligase-Puffer
 1 µl Ligase (1 unit)
 6 µl H₂O
 10x Ligase-Puffer: 200 mM Tris pH 7.6
 100 mM MgCl₂
 100 mM DTT
 6 mM ATP

Dieser Ansatz wurde üblicherweise 16 h bei 12°C inkubiert. Im Falle von "blunt-end"-Ligationen wurde die Reaktionstemperatur auf 16°C angehoben. Nach erfolgter Ligation konnte ein Aliquot dieses Ansatzes (5-10 µl) direkt zur Transformation eingesetzt werden; der Rest war bei -20°C mindestens vier Wochen lagerfähig.

Nick-Translation

Um DNA mit ^{32}P radioaktiv zu markieren, wird das Verfahren der Nick-Translation angewandt (Rigby *et al.* 1977). Hierbei wird die 5'→3' Exonukleaseaktivität von *E. coli* DNA-Polymerase I (Kornberg-Enzym) an durch DNase-Behandlung gesetzten Einzelstrangbrüchen (Nicks) ausgenutzt. So kann bei Zugabe von ^{32}P -markierten dNTP der ab dem gesetzten Nick neu synthetisierte Strang radioaktiv markiert werden. Für die Reaktion wurden 5 µg getrockneter DNA in 20 µl H₂O gelöst und nach Zugabe von 3 µl 10x Nick-Translation-Puffer und 1 µl einer 1:10000 frisch mit H₂O verdünnten DNase-Lösung (Konz.: 1 µg/ml) 10 min bei 16°C inkubiert. Nachdem anschließend die DNase durch 10minütige Inkubation bei 68°C inaktiviert wurde, erfolgte die Zugabe von je 1 µl dATP, dGTP und dTTP, von 50 µCi [α - ^{32}P]dCTP, von nochmals 2 µl Nick-Translation-Puffer sowie von 1 µl DNA-Polymerase I. Dieser Ansatz wurde mit H₂O auf 50 µl aufgefüllt und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Bis zur weiteren Verwendung konnte man die so radioaktiv markierte DNA bei -20°C lagern.

Nick-Translation-Puffer: 0.5 M Tris pH 7.2

0.1 M MgSO₄

1 mM DTT

500 µg/ml BSA

Sequenzierung von DNA nach dem Didesoxykettenabbruchverfahren

Für die Sequenzierung doppelsträngiger DNA nach dem Didesoxykettenabbruchverfahren (Sanger *et al.* 1977; Wallace *et al.* 1981) wurde im Wesentlichen so vorgegangen wie bei Heinrich (1986) beschrieben. Die dafür nötige reine und schonend isolierte DNA wurde nach dem oben geschilderten Schnellaufschlußverfahren gewonnen. 2 µg davon wurden nach Trocknung im Speed-Vac durch Aufnehmen in 40 µl Denaturierungspuffer (0.2 M NaOH, 0.2 mM EDTA) und 5minütiger Inkubation bei Raumtemperatur denaturiert und anschließend mit 4 µl 2 M Ammoniumacetat-Lösung pH 4.5 neutralisiert. Die so behandelte DNA wurde nun mit Ethanol präzipitiert und getrocknet. Der für die Sequenzierungsreaktion nötige Primer (hier: reverser pUC Plasmid Primer: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'; 2 pmol) wurde zusammen mit 1.5 µl "Annealing"-Puffer, 4 µCi [α -³⁵S]dATP (2 µl) und 9.5 µl H₂O zur DNA gegeben und 15 min bei 37°C inkubiert. Zu diesem Ansatz wurde 1 µl Klenow-Polymerase gegeben und gründlich durchmischt. Davon je 3 µl wurden in 4 vorbereitete, mit je 2 µl des entsprechenden Nukleotid-Mixes versehene Reaktionsgefäße pipettiert und 20 min bei 30°C inkubiert. Sodann kamen zu jedem Ansatz 1.5 µl "Chase"-Lösung mit nachfolgenden weiteren 15 min Inkubation bei 30°C. Nach Trocknung der DNA's wurden die Proben in je 4 µl Formamid-Lösung aufgenommen und vor dem Auftragen aufs Gel 2 min bei 95°C gekocht. 1 µl jedes Ansatzes wurde nach Vorelektrophorese (2000 V, 25 mA, 45 min) auf ein keilförmiges 5%iges Harnstoff-Polyacrylamid-Gradientengel (0.1-0.4 mm dick) aufgetragen, dessen Herstellung bei Heinrich 1986 ausführlich beschrieben ist. Die Elektrophorese wurde bei 2500 V, 30 mA, 65°C für ca. 2 h durchgeführt. Anschließend wurde zur Entfernung des Harnstoffes und zur Fixierung das Gel 15 min in 10%iger Essigsäure geschwenkt und

dann bei 80°C 1.5 h getrocknet. Die aufgetrennten DNA-Fragmente konnten durch Autoradiographie sichtbar gemacht werden.

10x "Annealing"-Puffer: 70 mM Tris pH 7.5
 70 mM MgCl₂
 0.3 M NaCl
 0.1 M DTT
 1 mM EDTA

Formamid-Lösung: 98% Formamid (entionisiert)
 10 mM EDTA
 0.2% Bromphenolblau
 0.2% Xylencyanol

Gellösung: 21 g Harnstoff
 6 ml 40% Acrylamid
 5 ml 10x TBE-Puffer
 0.3 ml 10% Ammoniumperoxodisulfat
 20 µl TEMED
 ad 50 ml H₂O
 diese Lösung wurde steril filtriert

"Chase"-Lösung: 125 µM dNTP

"A-Mix": 100 µM dTTP
 100 µM dCTP
 100 µM dGTP
 100 µM ddATP

"C-Mix": 100 µM dTTP
 10 µM dCTP
 100 µM dGTP
 100 µM ddCTP

"G-Mix": 100 µM dTTP
 100 µM dCTP
 5 µM dGTP
 120 µM ddGTP

"T-Mix": 5 µM dTTP
 100 µM dCTP
 100 µM dGTP
 500 µM ddTTP

Hybridisierung von DNA/RNA ("Northern Blot")

Das auf spezifische RNA zu testende Nukleinsäurenmaterial wurde auf einem Agarose-Harnstoff-Gel aufgetrennt. Für dieses Gel wurden die zu verwendenden Glasplatten gründlich mit SDS gereinigt, um etwaige Kontaminationen mit DNasen zu beseitigen. Das für dieses Vertikalgel nötige Stützgel wurde aus 20 µl 20x RNA-Puffer, 50 µl 10% SDS und 750 µl einer 30%igen Acrylamid-Bis-Lösung bereitet, die ad 5 ml mit H₂O verdünnt und nach dem Auflösen einer Spatelspitze Ammoniumperoxodisulfat mit 25 µl TEMED versetzt wurden. Durch Überschichten der Geloberfläche mit Wasser konnten Unebenheiten vermieden werden. Nach dem Erstarren des Stützgeles wurden 10.8 g Harnstoff in 12.6 ml H₂O und 1.4 ml 20x RNA-Puffer in der Hitze gelöst. Nach Abkühlung auf etwa 40°C wurde diese Lösung in die zwischenzeitlich bereitete Agarose-Lösung (0.45 g Agarose in 14 ml H₂O kochen) gegossen und gut gemischt. Diese Lösung mußte sofort frisch vergossen werden. Zur Erstarrung stand das Gel über Nacht bei 4°C.

Zur Vorbereitung der aufzutragenden Proben wurden die zu analysierenden Bakterien in 15 µl Lämmli-Puffer suspendiert und 3 min auf 95°C erhitzt. Nach Zugabe von 45 µl Formamid-Mix (100% Formamid, 0.02% Bromphenolblau, 0.02% Xylencyanol) wurden die Proben für weitere 10 min auf 75°C gehalten und konnten anschließend auf das Gel gegeben werden. Als Laufpuffer diente 1x RNA-Puffer. Die Elektrophoresedauer betrug bei einem Stromfluß von ca. 40 mA etwa 4 h. Die Auftrennung ist nach einer Laufstrecke für Bromphenolblau von etwa $\frac{2}{3}$ der Gellänge abubrechen. Für den eigentlichen Blot wurden ein Whatman 3MM Chr Filter und eine Hybond-Nylonmembran (Amersham) exakt auf die Größe des Geles zugeschnitten. Ebenso mußte ein etwa 10 cm hoher Stapel aus einzelnen, auch auf diese Größe zugeschnittenen Papierblättern vorbereitet werden.

Das Gel wurde auf ein Whatman Filter gelegt, welches mit den Enden in Blot-Puffer (20x SSC-Puffer) getaucht war und darauf zuerst die Nylonmembran und dann das zugeschnittene Whatman-Papier positioniert. Der für den Transfer nötige Kapillareffekt wurde durch Auflage des Papierstoßes (gut mit 1 kg beschwert!) erzeugt. Nachdem so über Nacht bei 4°C eine Übertragung der Nukleinsäuren aus dem Gel auf die Nylonmembran gelungen war, mußten diese auf der Membran durch 2stündiges Backen bei 80°C fixiert werden. Für die zur Absättigung nicht besetzter Bindungsstellen des Filters nötigen Vorhybridisierung mit Magermilchpulver wurde die Membran zusammen mit 20 ml der Vorhybridisierungslösung luftblasenfrei in einen Plastikbeutel eingeschweißt und 16 h bei 42°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Zur Hybridisierung kamen 50 µl der nicktranslatierten, radioaktiv markierten Probe, 150 µl H₂O und 200 µl Formamid dazu. Danach wurde die Inkubation über Nacht bei 42°C im Schüttelwasserbad (Stellung 20) fortgesetzt. Waschvorgänge (2 mal je 10 min bei Raumtemperatur, 2 mal je 30 min bei 68°C) mit 2x SSC, 0.1% SDS ermöglichten die Entfernung unspezifisch gebundener DNA. Nach Trocknung der Membran wurde zur Analyse der Banden ein Röntgenfilm aufgelegt und das erhaltene Autoradiogramm densitometrisch ausgewertet.

20x RNA-Puffer: 800 mM Tris

720 mM NaH₂PO₄

40 mM EDTA

20x SSC-Puffer: 175.3 g NaCl

88.2 g Na-Citrat in 800 ml H₂O lösen

pH mit 10n HCl auf 7.0 einstellen

ad 1 l mit H₂O auffüllen

Vorhybridisierungslösung: 5x SSPE

0.5% SDS

50% Formamid

0.15 g Magermilchpulver/20 ml

20x SSPE-Puffer: 174 g NaCl

27.6 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

7.4 g EDTA in 800 ml H_2O lösen

pH mit 10n NaOH auf 7.4 einstellen (etwa 65

ml)

ad 1 l mit H_2O auffüllen

Proteinchemische Methoden

Expression von Proteinen

T7 Expressionssystem

Zur Expression von Proteinen mit dem von Tabor und Richardson 1985 entwickelten System sollte der mit dem rekombinanten Vektor pT7-3 (-4, -5, -6) transformierte *E. coli* Stamm K38, der auch das Plasmid pGPl-2 enthält, bei 30°C gezogen werden, da sonst durch Aktivierung des lambda-Pl Promotors die für *E. coli* toxische T7-Polymerase überexprimiert wird. Dies hätte den sofortigen Zelltod zur Folge.

50 µl einer bei 30°C in LB-Medium gezogenen Übernachtskultur der auf Proteinexpression zu testenden Bakterienstämme wurden in 1 ml frischem LB-Medium unter Zusatz der Antibiotika Ampicillin (50 µg/ml) und Kanamycin (50 µg/ml) bis zu einer optischen Dichte von 0.5 bei 590 nm inkubiert.

Nach einer Aufteilung in Aliquots à 200 µl wurden diese 1 min in einer Eppendorffzentrifuge sedimentiert, mit insgesamt je 5 ml M9-Medium gewaschen und anschließend in je 1 ml M9-Medium aufgenommen. Dieses Medium mußte noch zu 20 µg/ml Thiamin (mit 2 µl einer 10 mg/ml Lösung) und 0.01% Aminosäuregehalt (mit 5 µl einer 2%igen Aminosäurenlösung) supplementiert werden, bevor die Bakterien 180 min bei 30°C unter Schütteln inkubiert wurden. Für die Induktion der T7 RNA-Polymerase-Synthese erfolgte nun eine 5minütige Temperaturerhöhung auf 42°C. Nach Rifampicinzugabe bis zu einer Konzentration von 200 µg/ml wuchsen die Bakterien weitere 10 min bei 42°C. Das Antibiotikum bewirkt eine totale Hemmung der *E. coli* RNA-Polymerase mit der Konsequenz, daß zur weiteren Transkription nur die T7 RNA-Polymerase zur Verfügung steht. Die nun folgende Absenkung der Inkubationstemperatur auf 30°C verhindert einen zu hohen Gehalt an T7 RNA-Polymerase, der für *E. coli* Zellen toxisch wäre. Nach 20minütiger Transkription konnten durch Zugabe von 10 µCi ³⁵S-Methionin (52.8 TBq/mmol) bei einer Pulsdauer von 5 min spezifisch plasmidkodierte Proteine radioaktiv markiert werden. Durch Zentrifugation (20 sec in der Eppendorffzentrifuge) wurden die Bakterien isoliert und in etwa 100 µl Lämmli-Puffer (siehe Kap. Elektrophorese) aufgenommen. Für die SDS-Gelelektrophorese wurden sie 3 min bei 95°C erhitzt und konnten so auf das Gel aufgetragen werden. Die resultierenden Gele wurden im Vakuum auf Whatman-Papier aufgetrocknet und zur Autoradiographie verwendet.

Aminosäure-Lösung: 2%ige Lösung von Ala, Arg, Asn, Asp, Gln,
 Glu, Gly, His, Ile, Leu,
 Lys, Phe, Pro, Ser, Thr,
 Trp, Tyr, Val
 also ohne Cys und Met!

Expression in JM83

Zur Expression plasmidkodierter Proteine (z. B. in pUC Vektoren oder in pKK223-3) wurde eine Übernachtskultur des zu testenden JM83 Klons mit LB-Medium 1:100 verdünnt. 25 ml davon wurden bei 37°C bis zu $A_{500} = 0.6$ inkubiert. Durch Zugabe von IPTG zu einem 5 ml Aliquot bis zu einer Konzentration von 1 mM und anschließender Inkubation für 4 h bei 37°C wurde versucht, die Transkription stromabwärts von dem auf dem Plasmid vorhandenen Promotor zu stimulieren. Die so gewachsenen Bakterien wurden abzentrifugiert (5000 Upm, 10 min, 4°C) und konnten als Niederschlag bei -20°C für einige Tage aufbewahrt werden. Nach Suspendieren der Bakterien in 200 µl 50 mM Tris pH 7.0 wurden 10 µl davon mit 20 µl Lämmli-Puffer vermischt, 3-5 min auf 95°C erhitzt und auf das Gel aufgetragen. Anschließend erfolgte eine Coomassie-Färbung oder ein "Western-Blot" des Gels.

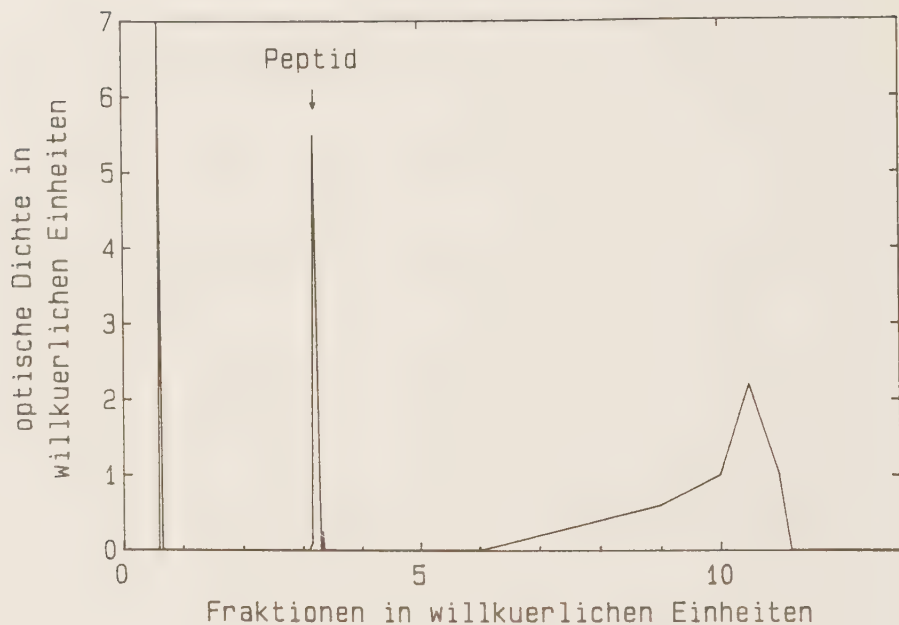


Fig. 1: Analyse der Reinheit des synthetisierten Peptids

Säule und Elutionsbedingungen sind im Text beschrieben.
Das Profil wurde mit einem Durchflußphotometer
aufgenommen.

Gewinnung von Antiserum

Peptid-Synthese

Das als optimal zur Immunisierung durch Analyse der Proteinsequenz mit dem Microgenie Programm (Beckman) bestimmte 13mer Oligopeptid



wurde von Dr. R. Mertz an einem Applied Biosystems Peptid-synthesizer hergestellt. Die Reinheit des von der Gelmatrix eluierten Peptids wurde über HPLC getestet (Fig. 1) und dieses so direkt eingesetzt. Für die Überprüfung wurde eine C18 "reversed phase" Säule von Macherey und Nagel, Düren eingesetzt. Zur Elution diente ein Wasser/Acetonitril Gradient (0 - 100 %, in Gegenwart von 0.01 % Trifluoressigsäure).

Kopplung des Peptids an einen Carrier

Da Peptide mit sehr kleinem Molekulargewicht (≈ 1000) kaum antigene Eigenschaften besitzen, ist eine kovalente Bindung des Haptens an ein hochmolekulares Protein als Carrier nötig (Erlanger 1980). Bei Verwendung von Carriern mit hoher Immunogenität kann die Immunantwort drastisch gesteigert werden. Allgemein werden als solche Carrier Proteine wie Serumalbumin (BSA), Ovalbumin, Fibrinogen oder Hämocyanin benutzt. Die kovalente Verknüpfung kann über mehrere Seitengruppen erreicht werden, so z.B. über die -Aminogruppe von Lysin (Reichlin 1980), die Hydroxyphenylgruppe von Tyrosin, die Sulfhydrylgruppe von Cystein (Bernatowicz und Matsueda 1986, Aldwin und Nitecki 1987), die Imidazolgruppe von Histidin oder über α -Aminogruppen, wobei die Kopplungen über Lysin und Cystein zu bevorzugen sind. Hier wurde einer Kopplung über Lysin mit Glutardialdehyd (Reichlin 1980) der Vorzug gegeben,

wobei der Aldehyd die beiden Peptide durch Schiffbasenbildung verknüpft.

30 mg des HPLC-gereinigten Oligopeptids wurden mit 20 mg Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) in 2 ml 0.1 M Na-Phosphatpuffer pH 7.0 gelöst. Zu dieser Mischung wurde langsam 1 ml einer 21 mM Glutardialdehyd-Lösung (84 µl einer 25%igen Lösung pro 10 ml) zugetropft und der Ansatz 24 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Überschüssiger Aldehyd wurde durch Dialyse gegen insgesamt 3 l 0.1 M Na-Phosphatpuffer pH 7.0 entfernt. Der vollständige Umsatz des eingesetzten Oligopeptids konnte durch Gelchromatographie an einer Sephadex G-25 Säule (25 x 2 cm) belegt werden. Bei Elution aus einer solchen Säule (Elutionsmittel: 0.1 M Na-Phosphatpuffer pH 7.0) sollten das Konjugationsprodukt KLH-Peptid und nicht umgesetztes KLH im Durchbruch, das Oligopeptid alleine deutlich retardiert erscheinen. Bei einem Betriebsfluß von 4 ml/h und einem Fraktionsvolumen von 1 ml eluiert zur Säulenkalibrierung aufgetragenes freies KLH in den Fraktionen 17-22. Daher wurden diese Fraktionen als Durchbruch definiert. Die Elution des Reaktionsansatzes zeigte einen Proteingehalt in den Fraktionen 17-23, in den folgenden Fraktionen bis 200 war kein Protein mehr nachzuweisen. Zur Feststellung des Proteingehaltes wurde ein Tropfen aus jeder Fraktion auf Whatman 3MM Papier aufgetrocknet, mit Ninhydrin eingesprüht und kurz erwärmt. Bei positiver Reaktion zeigte sich ein rötlicher Fleck. Da nach dem Durchbruch keinerlei Protein mehr von der Säule zu eluieren war, konnte von einem vollständigen Umsatz des Oligopeptids ausgegangen werden. Die Fraktionen 17-23 wurden vereinigt, aliquotiert und bei -70°C eingefroren.

Immunisierung

(in Anlehnung an Hurn und Chantler 1980)

Die humorale Immunantwort kann durch Beimengung von Adjuvantien zum Immunogen deutlich stimuliert werden. Deshalb wurden 1.5 ml des Oligopeptid-KLH-Konjugats (300 µg/ml) mit der äquivalenten Menge an komplettem Freund'schem Adjuvans durch Hin- und Herdrücken zwischen zwei total aus Glas bestehenden Spritzen (Kopplungsadapter und Spritzen wurden vom Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried zur Verfügung gestellt) so vermischt, daß eine stabile Wasser-in-Öl Emulsion entstand. Diese Suspension wurde drei Kaninchen in 5-8 Portionen subkutan injiziert, so daß jedes 1 ml erhielt. Durch die Anlage solcher Immunogendepots unter der Haut wird eine langsame Abgabe des Antigens an die Lymphflüssigkeit erreicht und damit eine evtl. toxische Wirkung zuverlässig ausgeschlossen. Mit wiederholten Gaben von Möhrchen, Salat und Löwenzahn konnten die Kaninchen für die gesamte Versuchszeit am Leben erhalten werden. Nach 4 Wochen erhielt jedes Kaninchen 0.5 ml des reinen Konjugates ohne Adjuvans in einer Portion als "booster", um Antisera mit möglichst hohem Titer zu erhalten. Bei allen Kaninchen waren kleine, unter der Haut liegende Kapseln an den Stellen fühlbar, an denen die erste Injektion stattfand. Dies ließ Rückschlüsse auf eine erfolgreiche Immunisierung zu.

Isolierung von Serum

(in Anlehnung an Hurn und Chantler 1980)

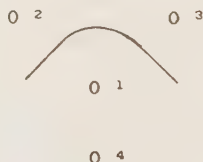
Jedem Kaninchen wurden durch Anritzen der Ohrvene an rasierter Stelle etwa 2 ml Blut entnommen. Zur Gewinnung von Serum wurden diese Blutproben 1 h im Wasserbad zur Koagulation bei 37°C gehalten und anschließend 15 min auf Eis gestellt. Daraufhin konnte das Serum durch Zentrifugation (20 min, 2000 Upm, Christ Labofuge 2) von Blutkörperchen gereinigt werden.

Test auf erfolgreiche Immunisierung

Ouchterlony-Test

Zur Sicherstellung einer erfolgreichen Immunisierung sollten die erhaltenen drei Antisera einem Test nach Ouchterlony (1958) unterzogen werden. Hierbei wird durch Diffusion von Antigen und Antikörper in einem Agarosegel zueinander im Bereich äquivalenter Konzentration die Bildung eines Präzipitates beobachtet. Für diesen Test wurden 500 mg Agarose in 50 ml 50 mM Phosphatpuffer pH 7.4 durch Erhitzen gelöst und mit 0.5 ml 2% NaN_3 in H_2O versetzt. Die gelöste Agarose wurde auf sechs gut gereinigte Objektträger aufgetropft, so daß eine durchgehende Fläche entstand. Nach dem Erstarren wurde das unten gezeigte Lochmuster dreimal eingestanzt (LKB Lochstanzer).

Jedes Loch fasste etwa 15 μl Flüssigkeit. Loch 1 enthielt das Kaninchenserum, Loch 2 das Konjugat KLH-Peptid (300 $\mu\text{g}/\text{ml}$), Loch 3 KLH (2 mg/ml) und Loch 4 reines Peptid (2 mg/ml). Nach über Nacht in der Kälte erfolgter Diffusion und anschließender Färbung der Präzipitate mit Amidoschwarz ergab sich folgendes Bild:



Deutlich sind Präzipitate bei KLH und dem Konjugat zu sehen. Daraus ist klar auf eine erfolgreiche Immunisierung zu schließen; die Abwesenheit einer Immunpräzipitatbildung mit dem Oligopeptid läßt sich mit der geringen Größe des Peptids erklären, die dazu anscheinend nicht ausreicht. Ob das gewonnene Serum auch Antikörper gegen das Peptid enthält, läßt sich leicht in einem ELISA-Test feststellen.

ELISA-Test

Zu Untersuchungen der Spezifität von Antisera wird in vielen Fällen ein ELISA-Test (enzyme-linked immunosorbent assay) herangezogen (Engvall *et al.* 1975). Hierbei werden die Vertiefungen in Microtiterplatten mit Antigen beschichtet und dessen Fähigkeit, Immunglobuline zu fixieren, über eine Farb-reaktion bestimmt.

Dazu wurde in 4 Reihen jede Vertiefung mit 100 µl einer Oligopeptid-Lösung (50 µg/ml in Coating Puffer) gefüllt, während weitere vier Reihen mit 100 µl einer 500 µg/ml Oligopeptid-Lösung (in Coating Puffer) versehen wurden. Die Bindung des Peptids an die Wände der Microtiterplatten geschah über Nacht durch Inkubation bei 4°C. Nicht gebundenes Antigen konnte durch 5maliges Waschen mit PBS-Puffer (10 mM Phosphat, 10 mM NaCl, pH 7.4) entfernt werden. Um auch unbesetzte Proteinbindungsplätze an den Vertiefungswänden zu blockieren, wurde jede Vertiefung mit PBS-Puffer, der 1% BSA enthielt, über Nacht bei 4°C inkubiert.

Auch hier wurde der Überschuß durch 5maliges Waschen mit PBS-Puffer entfernt. In den 10 Vertiefungen jeder Reihe wurden Verdünnungsreihen der 3 Sera gemischt (Volumen: 100 µl; Konzentration: 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280, 1:2500, 1:5000). Als Kontrolle diente ein Vergleichsserum nicht immunisierter Kaninchen, mit dem genauso verfahren wurde (jeweils in der 4. Reihe). Diesselben Verdünnungen wurden auch in den Vertiefungen, die mit höherer

Peptidkonzentration beschichtet waren, vorbereitet. Nach einer Inkubationszeit von 2 h bei Raumtemperatur wurden die Vertiefungen ausgesaugt und 5mal mit PBS-Puffer gespült, bevor in jede 100 μ l einer Lösung von Antikaninchen-Antikörpern, die mit Peroxidase gekoppelt waren, pipettiert wurden. Auch hier betrug die Inkubationszeit 2 h bei Raumtemperatur. Nach den üblichen Waschvorgängen mit PBS-Puffer wurden je 100 μ l einer Reaktionslösung in die Vertiefungen einpipettiert, die sich wie folgt zusammensetzte:

100 ml 0.1 M Na-acetat pH 6.0 (mit 0.1 M Citronensäure eingestellt) wurden mit 13.3 μ l 30% H_2O_2 versetzt. 9.9 ml davon wurden mit 0.1 ml einer Chromogen-Lösung (42 mM 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin in DMSO) vermischt.

Nach einer Inkubationszeit von 60 min bei Raumtemperatur wurden pro Vertiefung 100 μ l 2 M H_2SO_4 dazugegeben. Nach weiteren 30 min konnte eine Farbveränderung der Lösung von blau nach gelb beobachtet werden, die abhängig von der Antikörperkonzentration sein sollte. Das Ausmaß der Umsetzung des Chromogens zum gelben Farbstoff wurde durch Messung der optischen Dichte bei 450 nm bestimmt (Titertek Multiscan Photometer). Die graphische Darstellung der Meßwerte (Fig. 2) zeigt deutlich einen Anstieg der optischen Dichte von etwa 0.2 bei einer Verdünnung von 1:10 bis 0.55 bei 1:1280. Anschließend verringert sich die gemessene Extinktion wieder. Die gleichen Experimente mit dem Kontrollserum zeigen keinerlei Veränderung der optischen Dichte mit zunehmender Verdünnung.

Zu erwarten wäre bei hoher Serumkonzentration ein hoher Extinktionswert, der mit steigender Verdünnung abnimmt. Das hier vorliegende anfängliche Ansteigen der optischen Dichte läßt sich mit einem Prozoneneffekt erklären. Dieser Effekt wird vielfach bei Verwendung von sehr kleinen Peptiden zur Immunreaktion beobachtet und ist in einer Überlagerung des fixierten Oligopeptids mit Serumproteinen bei hoher Serumkonzentration begründet, so daß die spezifischen Immunglobuline in ihrer Bindung an das Antigen inhibiert sind (Adelmann-Grill, pers. Mitteilung). Dadurch wird der Zugang von Antikörpern an das Peptid unterbunden. Erst bei höherer Verdünnung kommt es zur optimalen Kopplung des Immunglobulins an das Antigen. Um zu zeigen, daß trotzdem bei sehr hohen Serumverdünnungen die Bildung des gelben Farbstoffes wieder abnimmt, wurde der ELISA-Test mit um den Faktor 10 höheren Verdünnungen (1:100, 1:200, 1:400,) wiederholt. Die resultierende Extinktionskurve (Fig. 3) zeigt nun deutlich den erwarteten Abfall mit steigender Verdünnung. Es läßt sich also durch diese Tests eindeutig belegen, daß Immunglobuline aus den gewonnenen Kaninchensera in der Lage sind, das Peptid zu erkennen und daran zu binden. Außerdem läßt sich eine Aussage über den Titer der Sera treffen: So zeigt das Serum von Kaninchen 2 die höchste Extinktion (damit besitzt es den höchsten Titer), dasjenige von Kaninchen 3 die geringste.

Coating-Puffer: 7 mM Essigsäure
 7 mM K_2HPO_4
 170 mM NaCl
 0.02 % NaN_3

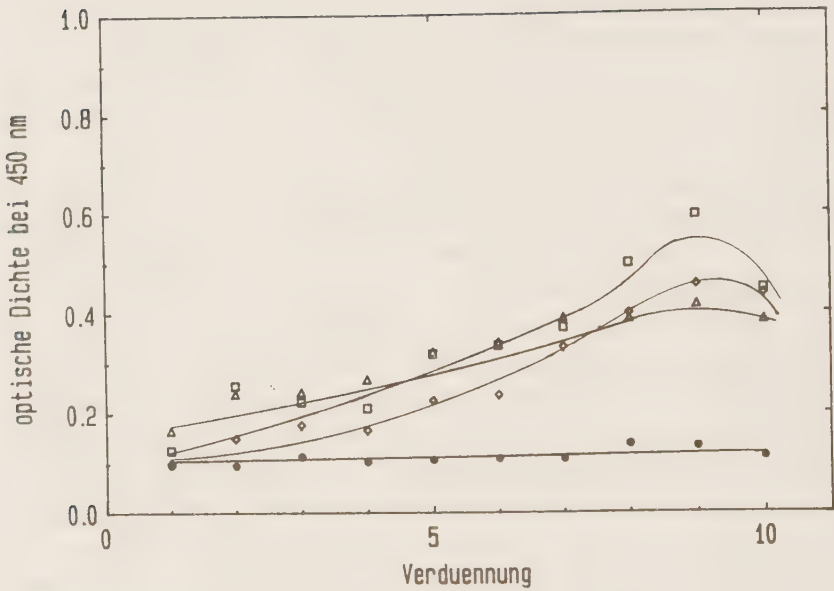


Fig. 2: Antikörper-Titerbestimmung in Kaninchensera mit Hilfe eines ELISA-Tests bei geringer Verdünnung

Durchgeführt wurde der ELISA-Test wie im Text beschrieben.

Die auf der Abszisse gegebenen Verdünnungseinheiten entsprechen pro ganzem Wert einer Verdünnung auf die Hälfte, wobei der Wert 1 für eine Serumverdünnung von 1/10 steht.

□ : Serum von Kaninchen 1

△ : Serum von Kaninchen 2

◇ : Serum von Kaninchen 3

● : Kontrollserum nicht immunisierter Kaninchen

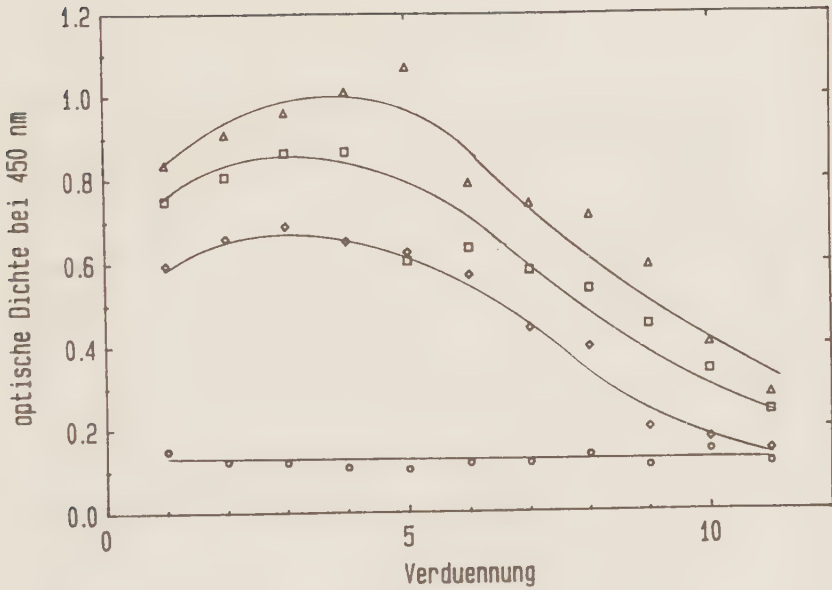


Fig. 3: Antikörper-Titerbestimmung in Kaninchensera mit Hilfe eines ELISA-Tests bei hoher Verdünnung

Durchgeführt wurde der ELISA-Test wie im Text beschrieben.

Die auf der Abszisse gegebenen Verdünnungseinheiten entsprechen pro ganzem Wert einer Verdünnung auf die Hälfte, wobei der Wert 1 für eine Serumverdünnung von 1/100 steht.

□ : Serum von Kaninchen 1

△ : Serum von Kaninchen 2

◇ : Serum von Kaninchen 3

○ : Kontrollserum nicht immunisierter Kaninchen

Inhibierung des ELISA-Tests

Wenn die Sera wirklich spezifische Antikörper enthalten, sollte eine Vorinkubation mit dem zur Immunisierung verwendeten Oligopeptid den anschließenden ELISA-Test inhibieren. Hierzu wurde eine Verdünnungsreihe für das Oligopeptid (Stammkonzentration: 500 µg/ml in PBS) folgendermaßen angelegt: 5 Eppendorfgefäße wurden mit je 90 µl PBS-Puffer gefüllt, in ein sechstes Gefäß kamen 100 µl der Antigen-Stammlösung. Davon wurden 10 µl in ein Reaktionsgefäß mit PBS gegeben und gut vermischt. Aus diesem wurden wiederum 10 µl in das nächste pipettiert, gemischt usw.. Zum Schluß wurden aus jedem Gefäß noch 30 µl verworfen, so daß letztendlich ein Volumen von je 60 µl zurückblieb. Zu diesen 60 µl kamen je 60 µl einer Serumverdünnung, die im ELISA-Test die höchste Extinktion hervorrief (1:1600 bei Kaninchen 2). Im Reaktionsgefäß betrug die Serumverdünnung damit 1:3200. Dieses Gemisch wurde über Nacht bei 4°C inkubiert. Als Kontrolle wurde mit BSA (Stammkonzentration: 1 mg/ml in PBS) die gleiche Verdünnungsreihe eingestellt und ebenso mit Serum inkubiert. Mit diesen vorinkubierten Antisera wurde ein ELISA-Test durchgeführt wie oben ausführlich beschrieben. Lediglich die weitere Verdünnung des Serums unterblieb. Die Auswertung dieses Tests (Fig. 4) ergab ohne jeden Zweifel eine sehr starke Inhibierung der Immunreaktion von Antikörpern, die mit dem Immunogen vorinkubiert waren. Diese Inhibierung zeigte die erwartete Abhängigkeit von der Verdünnung des Antigens. Durch die Vorinkubation des Serums mit BSA konnte keinerlei Inhibierung erzielt werden, was die hohe Spezifität der gewonnenen Antikörper gut belegt.

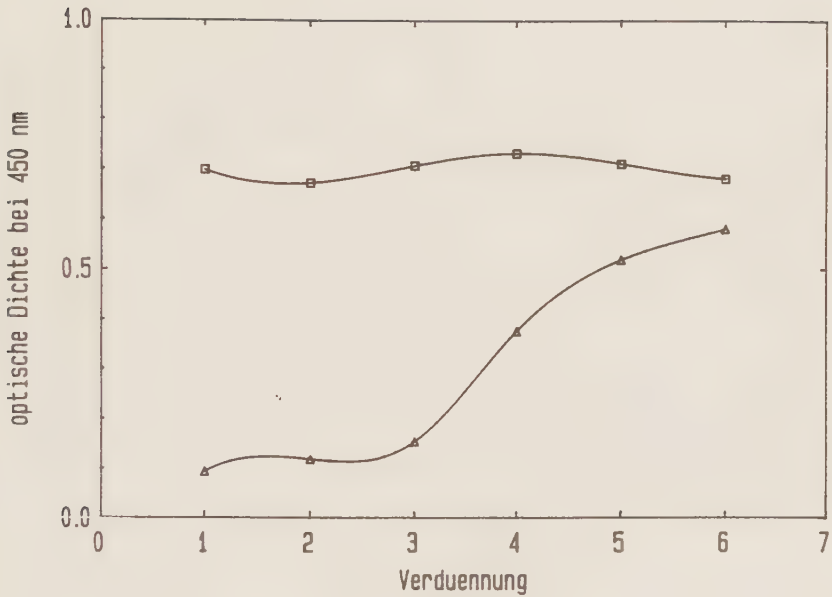


Fig.4: Hemmung der Antikörperbestimmung durch das zur Immunisierung verwendete Oligopeptid

Die Durchführung des Versuches ist im Text genau beschrieben.

Die auf der Abszisse für die Oligoverdünnung der Stammlösung (500 µg/ml in PBS-Puffer) angegebenen Einheiten stehen pro ganzer Einheit für eine 10fache Verdünnung, wobei der Wert 1 der unverdünnten Lösung entspricht.

▲ : Vorinkubation mit Oligopeptid

□ : Kontrolle: Vorinkubation mit einer BSA-Verdünnungsreihe, die derjenigen des Oligopeptids entspricht

Ausbluten der Kaninchen

Da in den oben beschriebenen Tests der Blutproben eine befriedigende Ausbeute an spezifisch reagierenden Antikörpern gefunden worden war, wurden die Kaninchen ausgeblutet. Hierbei nimmt man eine endliche Menge Serum in Kauf (im Gegensatz zur Blutabnahme nach Bedarf), riskiert aber nicht einen plötzlichen stressbedingten Exitus mit der Folge, noch nicht die benötigte Menge Serum isoliert zu haben. Zur Blutgewinnung wurden die Kaninchen vollständig am Ohr rasiert und über die frei-präparierte Ohrvene entblutet. Nach Beendigung des Blutflusses aus dem Ohr wurde restliches Blut durch Herzpunktion entnommen. Zur Gewinnung von Serum dienten die gleichen Verfahren wie bei der Präparation der vorher entnommenen Blutproben. Die nach der Zentrifugation resultierende Ausbeute betrug bei

Kaninchen 1	50 ml
Kaninchen 2	50 ml
Kaninchen 3	35 ml.

Das Serum wurde in je vier 10 ml und zehn 1 ml Aliquots geteilt und bei -70°C tiefgefroren.

Die durch Ausbluten gewonnenen Antisera mußten auch in ELISA-Tests nochmals charakterisiert werden, da auf Grund der Zeitdifferenz zur Entnahme der Blutproben auch eine Veränderung des Antikörpertiters denkbar gewesen wäre. Jedoch läßt die Auswertung dieser Tests (Fig. 5) keinen Verdacht auf Verringerung des Titers zu. Er scheint im Gegenteil sogar noch höher zu sein. Auch ist keine Differenz zwischen den Sera der drei Kaninchen mehr festzustellen, wohl aber wiederum der schon beschriebene Prozoneneffekt.

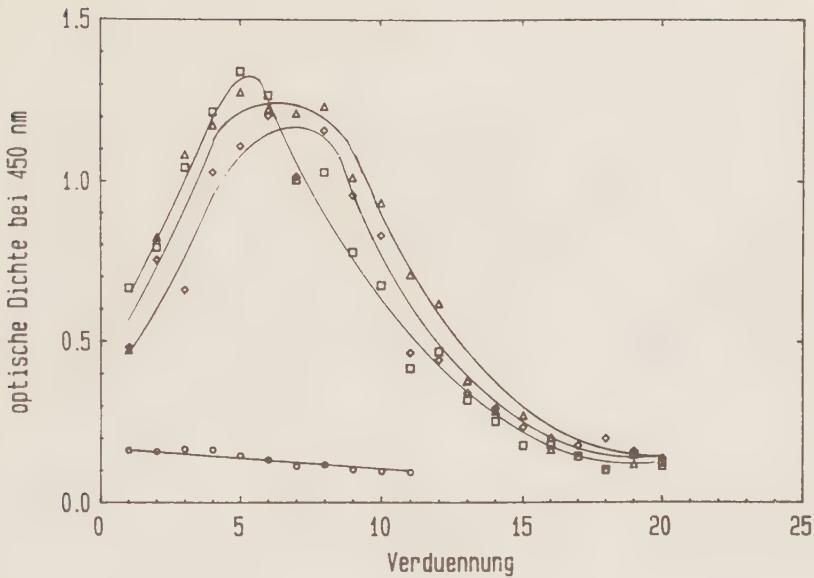


Fig. 5: ELISA-Test der Sera der ausgebluteten Kaninchen

Die Durchführung ist im Text genau beschrieben.
 Die auf der Abszisse angegebene Verdünnungseinheiten entsprechen pro ganzer Einheit einer 2fachen Verdünnung, wobei der Wert 1 für eine 1/10 Verdünnung der Sera steht.

□ : Serum von Kaninchen 1

△ : Serum von Kaninchen 2

◇ : Serum von Kaninchen 3

○ : Kontrollserum nicht immunisierter Kaninchen

Reinigung des Serums

Die Tatsache, daß sich in etlichen "Western blots", für die das isolierte, gereinigte Serum verwendet wurde, mehr Banden zeigten als eigentlich erwartet, läßt sich möglicherweise auf Kreuzreaktionen im Serum enthaltener anderer Immunglobuline zurückführen. Daher schien eine säulenchromatographische Reinigung des Serums angebracht zu sein. Bei Verwendung von an Sepharose gebundenem Protein A würden aus dem Serum alle darin enthaltenen Antikörper angereichert werden. Dieses Material wird deswegen hauptsächlich zur Reinigung monoklonaler Immunglobuline benutzt, bietet hier aber kaum Vorteile. Viel besser ist eine Chromatographie über Sepharose, die mit dem zur Immunisierung eingesetzten Antigen beladen ist (nach Hurn und Chantler 1980).

Kovalente Kopplung des Antigens an Epoxy-aktivierte Sepharose (nach Pharmacia 1986)

Ist das Antigen nur von geringer Größe, so besteht bei direkter Kopplung an die Gelmatrix auf Grund des kleinen Abstandes die Gefahr, Epitope nur schlecht dem Serum zu präsentieren. Daher ist die Verwendung von Spacern angeraten. Hier wurde Epoxy-aktivierte Sepharose 6B von Pharmacia benutzt. Bei diesem Material ist die Matrix über eine stabile Etherbindung mit einem 12atomigen, hydrophilen Spacer verknüpft, dessen reaktives Ende eine Epoxid-Gruppe darstellt. Daran kann ein nukleophiler Ligand über Amino-, Hydroxy- oder Thiolgruppen addiert werden. Für diese Kopplung wurden 11 g des Sepharose-materials über Nacht in Wasser nach Vorschrift des Herstellers vorgequollen, was zu einem Gelvolumen von 33 ml führte. Nach gutem Waschen mit etwa 500 ml H₂O wurde das Gel über einen gesinterten Glasfilter abgesaugt, zu in 0.1 M Carbonat-Puffer pH 9.5 gelöstem Oligopeptid (100 mg) gegeben und ad 100 ml aufgefüllt.

Die Konzentration an Peptid sollte etwa 1 mg/ml betragen. Diese

Suspension wurde 2 Tage langsam bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend erfolgte durch extensives aufeinanderfolgendes Waschen mit H₂O, 100 mM Bicarbonat-Puffer pH 8.0 und 100 mM Acetat-Puffer pH 4.0 die Reinigung des Säulenmaterials, bevor mit 1 M Ethanolamin durch Inkubation über Nacht bei 40°C (leichtes Schütteln!) die nicht gekoppelten Epoxid-Gruppen blockiert werden konnten. Restliches Ethanolamin wurde durch Waschen mit PBS-Puffer entfernt; anschließend konnte das Material in azidhaltigem PBS-Puffer bei 4°C gelagert werden.

Chromatographie

Eine 30 x 1.5 cm Biorad-Säule wurde zu einem Drittel mit vorgequollenem Sephadex G-50 fine (1 g liefert 10 ml Gelbett) gefüllt. Auf dieses Material kam ein Whatman GF/C Filter, auf diesen anschließend das vorbereitete Sepharosegel, welches ebenfalls mit einem Whatman GF/C Filter zur Vermeidung von Aufwirbelungen bedeckt wurde. Sephadex G-50 ist ein zur Entsalzung von Proteinlösungen bestens geeignetes Molekularsieb. Da zur Elution gebundener Antikörper NaSCN verwendet wurde, welches wegen seiner chaotropen Eigenschaften sehr schnell Proteine zur Funktionsunfähigkeit zerstören kann (Murphy *et al.* 1976), war eine schnelle Trennung von Antikörper und NaSCN nötig, die durch dieses Molekularsieb gewährleistet war. Alternativ zur Abtrennung von NaSCN durch Gelfiltration wäre die Dialyse des Eluats möglich. Allerdings besteht hier die Gefahr von größeren Ausbeuteverlusten und auch möglicherweise der weiteren Verwendung schädenden Veränderungen der Antikörper. Sowohl zur Equilibrierung als auch zur Elution diente PBS-Puffer.

Für die eigentliche Chromatographie wurde der Puffer bis knapp an den Whatman-Filter abgelassen und anschließend 3 ml des zu reinigenden Serums aufgetragen. Nachdem dieses fast vollständig in die Säule eingewandert war, wurde mit 4 ml PBS-Puffer überschichtet und die Chromatographie fortgesetzt. Über Nacht wurde die Trennsäule mit ca. 400 ml Elutionspuffer gespült, um sie frei von allen nicht bindenden Proteinanteilen zu bekommen. Das Elutionsprofil (Fig. 6) der bei 280 nm gemessenen 5 ml Fraktionen zeigt in den Fraktionen 6-27 die ausgewaschenen Proteine. Zur Elution der gebundenen Immunglobuline wurde der Puffer wieder bis zur Geloherfläche abgelassen, worauf das Auftragen von 2 ml 3 M NaSCN folgte. Nach dem Einwandern erfolgte ebenso eine Überschichtung mit 4 ml PBS-Puffer. Die Fraktionsgröße wurde zur Bildung eines scharfen Profils auf 2.5 ml reduziert. Zur Aufnahme dieses Profils wurde der Anteil an eluiertem Protein durch Messung der optischen Dichte bei 280 nm bestimmt. Das Profil zeigt klar neben den nicht gebundenen Serumproteinen (Fraktionen 5-26) zwei scharfe, verschieden hohe Gipfel bei den Fraktionen 77-80 und 82. Zur Kontrolle der Abtrennung des Elutionsmittels NaSCN wurden Aliquots der Fraktionen mit einigen Tropfen einer FeCl_3 -Lösung gemischt. In Gegenwart von bereits sehr geringen Mengen SCN^- -Ionen sollte die Bildung eines roten Farbkomplexes sichtbar werden. Dies war ab Fraktion 84 der Fall, so daß man sicher von einer gelungenen Salzabtrennung ausgehen konnte.

Welcher der beiden Elutionsgipfel nun tatsächlich die gesuchten Antikörper enthält, sollte in "Western Blots" untersucht werden. Diese wurden durchgeführt wie weiter unten beschrieben, wobei in Parallelansätzen sowohl mit nach Transformation mit pUC8-3d^{rif} Rifampicin-resistenten als auch mit sensitiven Bakterien die beiden jeweils vereinigten Gipfelfraktionen als Antikörper eingesetzt wurden. Die Analyse mit [^{125}J]Protein A und anschließender Autoradiographie zeigt bei densitometrischer Auswertung lediglich in den Versuchen mit dem ersten, großen Proteingipfel (Fraktionen 77-80) sichtbare Banden (Fig. 7 Spur

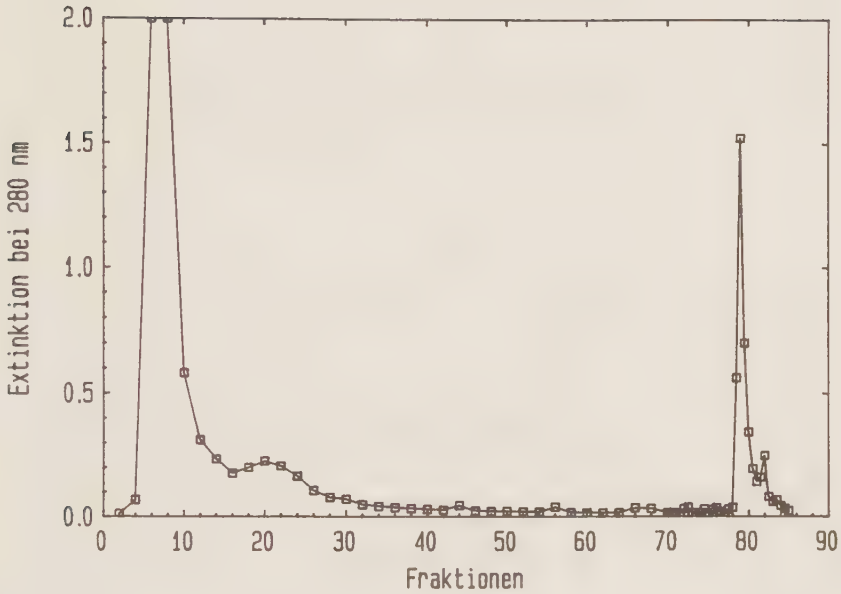


Fig. 6: Elutionsprofil der Immunoaffinitätssäule

Die Immunoaffinitätschromatographie wurde wie im Text beschrieben an der Peptid-Sepharose 6B/Sephadex G-50 Säule durchgeführt.

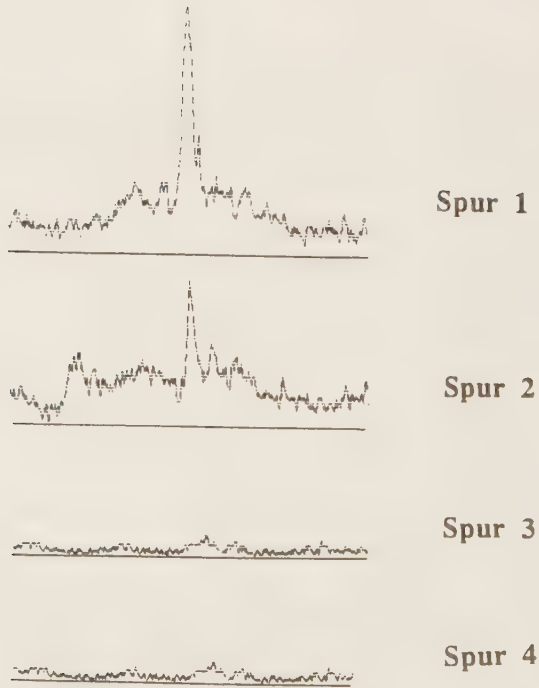


Fig. 7: Densitometrische Auswertung eines "Western Blots" unter Verwendung der beiden durch Immunoaffinitätschromatographie gewonnenen Antikörperfraktionen

Die Durchführung ist im Text ausführlich beschrieben.

Spur 1, 3: lysierte JM83 Bakterien mit pUC8-3d^{rlf}

Spur 2, 4: lysierte JM83 Bakterien mit pUC18 ohne Insert

Die Spuren 1 und 2 wurden mit Serum aus den Fraktionen 77-80 inkubiert, die Spuren 3 und 4 mit Serum aus der Fraktion 82.

Die Verwendung von pUC18 statt pUC8 als Vektor für die in den Spuren 2 und 4 gezeigten Versuchen kann keine Bedeutung beigemessen werden, da diese Vektoren sich lediglich im Polylinkerbereich unterscheiden.

Der zweite Peak enthält also keine kreuzreagierenden Immunglobuline und kann daher vernachlässigt werden. Weiter auffällig ist das Erscheinen einer Bande bei JMB3 Bakterien mit pUC18 ohne Insert an etwa der gleichen Stelle im Elektropherogramm wie bei Bakterien mit inserthaltigem Vektor. Ihre Intensität ist aber deutlich herabgesetzt.

Immunpräzipitation

Diese Methode wurde in Anlehnung an Herrmann und Mescher (1979) modifiziert und den anderen Mengenverhältnissen angepasst. Es wurde ein *E. coli* K38 Stamm, der die Plasmide pGPl-2 und pT7-3 mit dem inserierten 3d^{r,f} Fragment enthielt, so behandelt wie oben beschrieben. Allerdings betrug die Wachstumszeit nach dem ³⁵S-Methionin-Puls zwölf Stunden bei Raumtemperatur, um die Ausbeute an radioaktiv markiertem Protein zu erhöhen. Die abzentrifugierten und in 10 µl Puffer (1% SDS, 50 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA) suspendierten Zellen wurden zur Zellwandlyse 2 min bei 95°C gekocht und anschließend mit 330 µl Tritonpuffer (2% Triton X-100, 50 mM Tris pH 8.0, 1mM EDTA) versetzt, so daß die Lösung letztendlich 0.03 %ig an SDS war. Eine 10minütige Zentrifugation bei 4°C bewirkte die Abtrennung der lysierten Zellwände. Der so gewonnene Überstand wurde nach Inkubation (1 h, 4°C) mit 20 µl gereinigtem Serum, was zur Bildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes führte, mit einem Überschuß an Protein A Sepharose (≈10 mg) versetzt. Protein A bindet an die Fc-Region von Immunglobulinen (Spiegelberg 1974) und ermöglicht auf diese Weise die Fixierung von Immunkomplexen an das Sepharosematerial. Dazu wurde eine Stunde unter gutem Schütteln bei 4°C inkubiert. Das nach Zentrifugation (15-20 min, 11000 Upm, 4°C) erhaltene Sepharose-Gel wurde dreimal mit Tritonpuffer gewaschen, aus einem Aliquot davon durch Kochen in Lämmli-Puffer (Lämmli 1970) die gebundenen Proteine freigesetzt und auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt.

Western Blot

Der immunologische Nachweis von Proteinen, die über ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt worden sind, ist mit der Technik des "Western Blots" möglich (Burnette 1981, Lin und Kasamatsu 1983, Russel und Model 1984, Kaufmann *et al.* 1987). Hierzu müssen die im Gel getrennten Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran (BA-85, Schleicher und Schüll) transferiert werden, wozu generell drei Methoden zur Auswahl stehen:

Kapillardiffusion, Elektroblob in Puffer, und Elektroblob halbtrocken. Hier wurde immer der halbtrockene Elektroblob verwendet, da damit in vernünftiger Zeit reproduzierbar gute Resultate erzielt werden konnten. Für den Blot wurden 2x 3 Whatman 3MM Filter auf Gelgröße zugeschnitten, ebenso die Nitrocellulose-Membran. Anschließend wurden drei solche Whatman Filter nach guter Durchtränkung mit Blot-Puffer (25 mM Tris pH 8.3, 192 mM Glycin, 10% Methanol) auf eine Blotting-Apparatur gelegt (Biometra). Darauf kam vorsichtig deckungsgleich das Trenngel, gefolgt von der Membran, die gut mit Blot-Puffer benetzt wurde. Abschließend folgten wiederum drei getränkte Whatman Filter. Nach Verschließen und Beschweren des Gerätes wurden bei einem Stromfluß von etwa 60 mA binnen 30 min die Proteine auf die Nitrocellulose-Membran übertragen. Nach dem Transfer mußten durch Waschen mit 5% BSA in TBS-Puffer (0.05 M Tris pH 8.0, 0.15 M NaCl) die nicht besetzten Bindungsstellen auf der Membran blockiert werden. Überschüssiges BSA wurde durch 2maliges Waschen in TBS entfernt. Nun konnte die Membran mit der Serumlösung (1 ml Serum in TBS/1% BSA) für 2 h bei Raumtemperatur geschüttelt werden. Nach der üblichen Waschprozedur konnten die Antigen-Antikörperkomplexe auf unterschiedliche Arten sichtbar gemacht werden (Fig. 8):

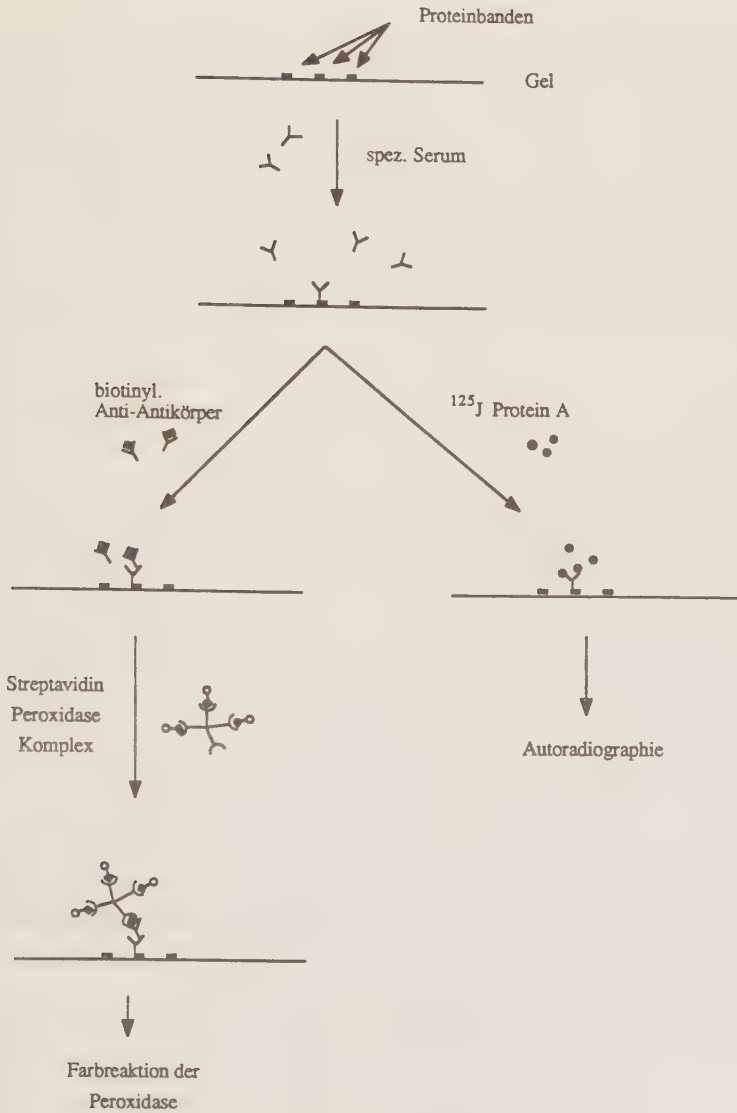


Fig. 8: Zwei Möglichkeiten zur Entwicklung von "Western Blots"

Die erste Möglichkeit besteht in der Kopplung biotinylierter Anti-Kaninchen-Antikörper an die Immunkomplexe. Das Vitamin Biotin besitzt eine sehr hohe Bindungsaffinität zu Streptavidin, welches selbst mehrere Biotin-Bindungsstellen besitzt. Diese Tatsache wird bei der Fixierung eines sog. Streptavidin-Peroxidase-Komplexes an den Antikörper-Komplex ausgenutzt. Dieser Komplex besteht aus Streptavidin, an das über mehrere Biotinmoleküle Meerettich-Peroxidase gebunden ist. Durch die Verwendung dieses Komplexes stehen also pro fixiertem Antikörper mehrere Moleküle Peroxidase zur anschließenden Farbreaktion zur Verfügung, wodurch eine erhebliche Steigerung der Sensitivität erreicht wird. Zur Kopplung des biotinylierten zweiten Antikörpers wurde dieser etwa 1:200 verdünnt in TBS/1% BSA 1 h mit der Membran inkubiert. Der nicht gebundene Anteil mußte sorgfältig durch mehrmaliges Waschen mit TBS entfernt werden. Anschließend erfolgte eine einstündige Inkubation mit dem 1:400 in TBS/1% BSA verdünnten Streptavidin-Peroxidase-Komplex, dessen Überschuß ebenfalls gründlich gewaschen wurde. Das Enzym Peroxidase katalysiert in Gegenwart von H_2O_2 die Oxidation von Chromogenen wie z. B. 3,3-Diaminobenzidin. Die Membran wurde in eine Lösung dieses Enzymsubstrates (0.5 mg/ml in H_2O) gelegt und nach Zugabe von H_2O_2 bis zu einer Konzentration von 0.02 % erfolgte langsam eine Färbung der Komplexe nach rotbraun (De Blas und Cherwinski 1983). Die Membranen mit den so sichtbar gemachten Banden konnten nach Trocknung unter Rotlicht bei Vermeidung von Helligkeit gut aufbewahrt werden.

Die zweite Möglichkeit zur Ortung der kreuzreagierenden Proteinbanden besteht in der Verwendung von Protein A, das über Bolton-Hunter-Reagentien mit ^{125}J radioaktiv markiert war (Bolton und Hunter 1973). Hier wird die Bindung von Protein A an die Fc -Region von Immunglobulinen ausgenutzt. Für diese Reaktion wurde die Nitrocellulose-Membran 2 h mit $1.5 \mu\text{Ci}$ [^{125}J]Protein A inkubiert und nach anschließendem gründlichem Waschen und Trocknen der Autoradiographie unterzogen.

Membrantrennung

Die Isolierung und Trennung von Bakterienmembranen wurde im Wesentlichen wie bei Osborn *et al.* (1982), Witholt *et al.* (1976) und Kollenda (1981) beschrieben durchgeführt. Dazu wurde eine Übernachtskultur (25 ml in LB) der entsprechenden Bakterien in 800 ml LB-Medium gegeben und 15 h bei 37°C geschüttelt. Nach schonender Zentrifugation (GS3 Rotor, 5000 Upm, 10 min, 4°C) wurden die Bakterien in insgesamt 40 ml eiskaltem 200 mM Tris pH 8.0 bei 4°C aufgenommen und langsam nacheinander mit 0.4 ml 10 mM EDTA, 80 ml 200 mM Tris pH 8.0 + 1 M Saccharose und 7.2 mg Lysozym versetzt. Nach Zugabe von weiteren 120 ml H_2O bei Raumtemperatur wurde bei 37°C 30 min inkubiert. Die durch Zentrifugation (GS3 Rotor, 8000 Upm, 10 min, 4°C) gewonnenen Spheroplasten wurden in 30 ml eiskaltem TE-Puffer (10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA) aufgenommen und im Eis-Wasser-Bad 4 x 20 sec beschallt (Sonifier B12, Macrotip, Stellung 6). Noch vorhandene ganze Zellen konnten durch Zentrifugation (GS3 Rotor, 5000 Upm, 10 min, 4°C) entfernt werden. Der Überstand wurde zur Gewinnung des enthaltenen Membrananteils 1.5 h im 45Ti Rotor bei 30000 Upm und 4°C ultrazentrifugiert. Nach sorgfältiger Suspension des Rückstandes in 10 ml 0.25 M Saccharose, 3.3 mM Tris pH 7.5, 1 mM EDTA wurde die Zentrifugation wiederholt.

Der nun erhaltene Rückstand, der sich sowohl aus der inneren als auch aus der äußeren Membran zusammensetzte, wurde in 1 ml 25% Saccharose, 10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA aufgenommen und in einer Spritze homogenisiert. Die Trennung der Membranen erfolgte auf einem Stufengradienten aus 0.6 ml 55% und je 2 ml 50%, 45%, 40%, 35% und 30% Saccharose (in 10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA) durch Ultrazentrifugation (SW41 Rotor, 35000 Upm, 13 h, 18°C). Es wurden drei Banden erhalten, die durch Punktion mit einer Spritze aus dem Gradienten abgezogen wurden. Nach Verdünnung der Membranfraktionen auf etwa 10% Sucrose mit 1 mM EDTA folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt im 60Ti Rotor (50000 Upm, 1.5 h, 4°C). Die so gewonnenen Membranen wurden in wenig 1 mM EDTA aufgenommen, mit 1 mM EDTA auf identische OD₂₈₀ eingestellt (sollte in erster Näherung eine vergleichbare Proteinkonzentration zur Folge haben) und bei -20°C aufbewahrt.

Proteinreinigung mit Ionenaustauscher (nach Höß *et al.* 1988)

Zur Proteinexpression wurden 5 ml einer Übernachtskultur 4 h in 100 ml LB-Medium bei 37°C inkubiert und anschließend abzentrifugiert (SS34 Rotor, 8000 Upm, 5 min, 4°C). Nach Suspension der Bakterien in 2.5 ml Bindepuffer wurde Lysozym bis zu einer Konzentration von 5 mg/ml zugegeben und 15 min bei 4°C zur Lyse der Bakterien inkubiert. Durch Behandlung mit Ultraschall (3 x 20 sec, Sonifier B12, Microtip, Stellung 2 im Eiswasserbad) konnte die Lysis vervollständigt werden. Nach 15minütiger Inkubation auf Eis erfolgte die Zugabe eines gleichen Volumens an Q-Sepharose FF (gut in Bindepuffer equilibriert) und eine Inkubation für 2 h bei 4°C unter gutem Schütteln zur Bindung von Proteinen an das Austauschermaterial. Das Gel wurde durch Zentrifugation (5000 Upm, 15 min, 4°C) von nicht gebundenen Anteilen abgetrennt, im gleichen Volumen Elutionspuffer suspendiert und zur Freisetzung fixierter Proteine 15 min bei 4°C geschüttelt.

Der durch Zentrifugation (5000 Upm, 15 min, 4°C) gewonnene Überstand wurde nochmals 20 min bei 10000 Upm und 4°C zentrifugiert und konnte dann direkt einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen werden.

Für die Reinigung von Membranproteinen über Ionenaustauscher wurden diese nach der letzten Ultrazentrifugation gewonnenen Membranniederschläge direkt in Bindepuffer suspendiert, homogenisiert und wie oben beschrieben weiterbehandelt (inklusive Einstellung auf gleiche OD₂₈₀ mit Bindepuffer).

Bindepuffer: 50 mM Tris pH 8.0

50 mM NaCl

1 mM EDTA

1 mM DTT

1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)

1 mM Aminoacetonitrilhydrogensulfat (AANS)

10 % Glycerin

0.5% Nonidet P-40

Elutionspuffer: wie Bindepuffer, aber 500 mM NaCl statt 50 mM

Herstellung von Zellextrakten

Zur Gewinnung von Zellextrakten wurden Übernachtskulturen der entsprechenden Bakterienstämme 1:50 mit LB-Medium auf 5 ml verdünnt und bis zu einer OD₆₆₀ = 1.0 wachsen gelassen. Nach Sedimentierung der Bakterien (SS34 Rotor, 10000 Upm, 20 min, 4°C) wurden sie in 500 µl Aufschlußpuffer suspendiert und im Eiswasserbad beschallt (Sonifier B12, Microtip, Stellung 2, 2 x 20 sec). Der so erhaltene Extrakt wurde zu weiteren Versuchen direkt eingesetzt.

Aufschlußpuffer: 10 mM Tris pH 7.9
 10 mM MgCl₂
 100 mM EDTA
 10 mM Mercaptoethanol

Chloroformextraktion (nach Wilson *et al.* 1977)

Zur Isolierung von Rifampicin und Rifampicin-Abbauprodukten aus Zellextrakten (gewonnen wie oben beschrieben) wurden diese mit dem gleichen Volumen Chloroform (500 µl) versetzt und gut geschüttelt. 10 µl der abgenommenen Chloroformphase, welche jetzt durch das Antibiotikum rot gefärbt war, wurden zur Trennung der enthaltenen Rifampicin-Abkömmlinge auf Dünnschichtplatten (Silica Gel 60F, Merck) aufgetragen und in Chloroform/Methanol 80:20 laufen gelassen. Die Analyse der Produkte erfolgte unter kurzzeitigem UV-Licht (254 nm).

SDS-Proteingelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte auf denaturierenden 15%igen SDS-Polyacrylamid-Gelen der Trennlänge 10 cm wie bei Lämmli (1970) und Lugtenberg *et al.* (1975) beschrieben.

	Trenngel-Lösung		Sammelgel-Lösung
30 % Acrylamid	15.0 ml		1.7 ml
2 % Bisacrylamid	1.3 ml		0.7 ml
1 M Tris pH 8.7	11.2 ml	pH 6.9	1.25 ml
10 % SDS	0.3 ml		0.1 ml
Wasser	2.2 ml		6.3 ml
TEMED	25 µl		25 µl
10 % PER	100 µl		50 µl

Auftragspuffer: 0.65 ml 1 M Tris pH 6.8
3.0 ml 10 % SDS
1.0 ml Glycerin
1.0 ml 0.1 % Bromphenolblau
ad 10 ml mit H₂O auffüllen
vor Gebrauch pro ml 50 µl Mercaptoethanol
dazugeben

Elektrophoresepuffer: 3.0 g Tris
14.4 g Glycin
10.0 ml 10 % SDS
ad 1 l mit H₂O auffüllen

Die Gele wurden entweder mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt
oder nach Fixierung in 25 % i-Propanol, 10 % Eisessig
getrocknet und teils mit, teils ohne Verstärkerfolie (Dupont
Cronex Quanta IIB) autoradiographiert.

ERGEBNISSE

Das von Heinrich 1987 klonierte und sequenzierte, Rifampicinresistenz vermittelnde DNA-Fragment (3d^{rif}-Fragment) weist im Vergleich zum identischen Genabschnitt eines *Escherichia coli*-Wildtypstammes Mutationen auf (Heinrich 1987) (Fig. 9). Die erste, nicht völlig gesicherte Mutation findet sich bei Position 227 mit einem Austausch von G gegen A, der allerdings bei der Sequenzierung nur auf einem Strang festgestellt werden konnte. Die zweite liegt bei Nukleotid 1262 mit einer Deletion von vier Guaninresten (1262-1265). Die Analyse der Sequenz dieses 3d^{rif}-Fragmentes ergab die Existenz zweier offener Leserahmen, die für potentiell in das Resistenzphänomen involvierte Proteine kodieren könnten. Leserahmen I reicht von Base 321 bis Position 638, Leserahmen IIb von 726 bis 2081. Die Austauschmutation befindet sich also außerhalb der Leserahmen, die Deletionsmutation führt zu einem Wechsel des Wildtyp-Leserahmens IIa bei Nukleotid 1262 und damit zu einer Verlängerung bis Base 2081. Ob eine der beiden Mutationen oder beide zusammen für die Ausbildung der Resistenz verantwortlich sind, sollte in den nachstehenden Experimenten geklärt werden.

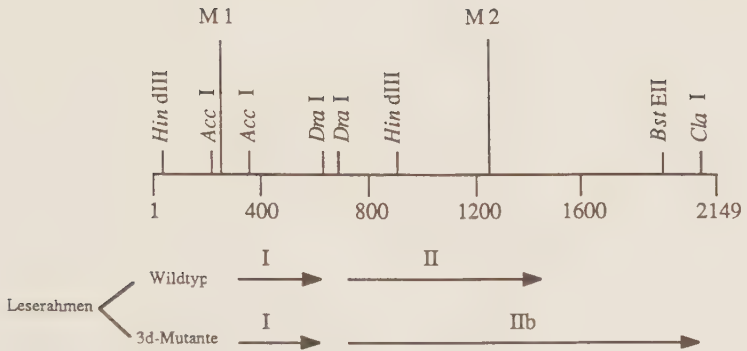


Fig. 9: Restriktionskarte des WT- α Fragmentes nach Heinrich (1987)

Es sind nur die in der Arbeit erwähnten Schnittstellen angegeben. Eine umfassende Auflistung aller Schnittstellen ist im Anhang zu finden. Die auf dem Fragment befindlichen offenen Leserahmen sind durch Pfeile dargestellt, wobei mit Wildtyp das WT- α Fragment gemeint ist.

M1: Position 227 mit dem Austausch von G gegen A

M2: Position 1262-1265 mit der Deletion von vier Guaninresten, auf Grund derer sich die Gesamtgröße des 3d^{rif} Fragmentes zu 2145 bp verändert.

Schnittstellen:

HindIII: bei 36 und 884 bp
AccI : bei 201 und 362 bp
DraI : bei 647 und 695 bp
BstEII : bei 1878 bp (bzw. 1874 bp in 3d^{rif})
ClaI : bei 2088 bp (bzw. 2084 bp in 3d^{rif})
BamHI : bei 1 und 2149bp (bzw. 2145 bp in 3d^{rif})

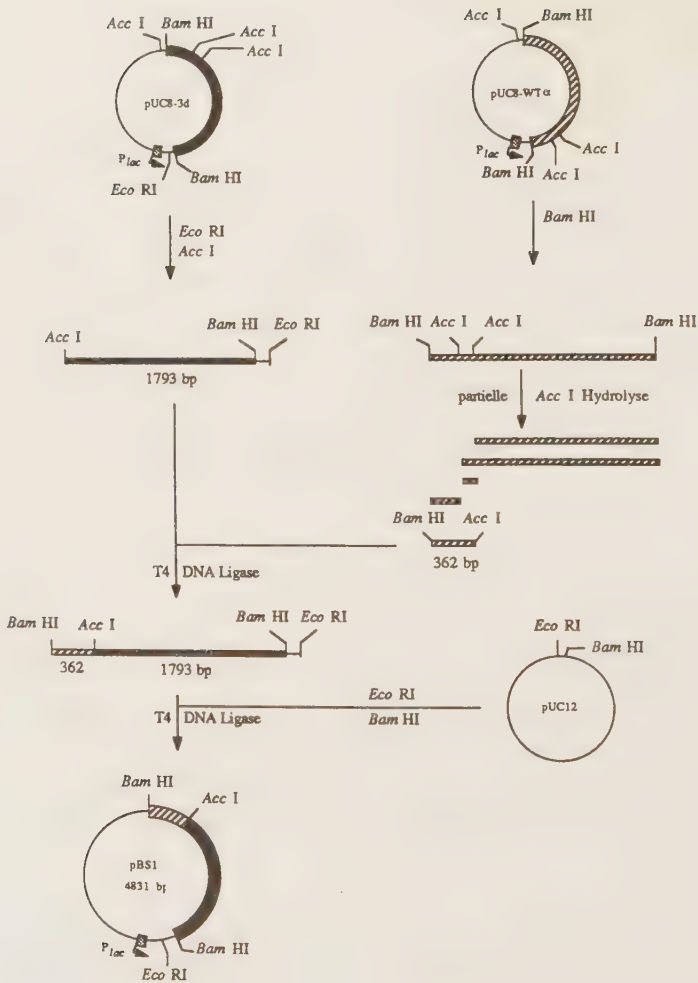


Fig. 10: Klonierungsstrategie zur Gewinnung eines aus Wildtyp- und Mutantenanteilen bestehenden Fragmentes

Das resultierende rekombinante Plasmid wird als pBS1 bezeichnet. Das für die Konstruktion dieses Plasmides verwendete Plasmid pUC12 unterscheidet sich von pUC8 nur im Polylinker, der bei pUC12 mehr Restriktionsschnittstellen enthält (Vieira und Messing 1982). Die für die einzelnen Klonierungsschritte gewählten Bedingungen entsprechen den im Methodenteil ausführlich beschriebenen.

An den Vektoren und Fragmenten sind nur die für die vorgenommenen Manipulationen relevanten Schnittstellen eingezeichnet.

Rekombination von 3d^{rif} aus Wildtyp- und Mutantenfragmenten

Um den Einfluß der beiden Mutationen unabhängig voneinander untersuchen zu können, ist es nötig, sie durch Hydrolyse mit geeigneten Restriktionsenzymen und anschließender Fragmentisolierung voneinander zu trennen. Hydrolysiert man das dem 3d^{rif}-DNA-Abschnitt entsprechende Wildtyp-Fragment (WT- α) auf gleiche Weise, so erhält man zur 3d^{rif}-Spaltung identische Fragmente, die sich lediglich durch das Fehlen der Mutationen unterscheiden. Eine Rekombination sich gegenseitig zu 2145 bp ergänzender Fragmente des Wildtyps und der Mutanten sollte zu einer DNA-Sequenz führen, die nur noch die Deletion allein als Mutation enthält. Die in diesem Fall gewählte Klonierungsstrategie ist in Fig. 10 dargestellt.

Orientierung von 3d^{rif} in pUC8

Für eine erfolgversprechende Klonierung nach oben gezeigter Strategie (Fig. 10) ist es notwendig, sich über die Orientierung des 3d^{rif} Inserts im Vektor im Klaren zu sein. Um diese zu bestimmen, wurde das inserthaltige Plasmid mit *Hind*III geschnitten. Dieses Enzym wurde gewählt, da für es eine Schnittstelle im Polylinker des Vektors (Polylinkersequenz zwischen der Klonierungsstelle *Bam*HI und der *Hind*III Stelle: GATCCGTCGACCTGCAGCCA) und zwei weitere im 3d^{rif} Gen bei bp 36 und bp 884 existieren. Je nach Orientierung entstehen bei der Hydrolyse Fragmente folgender Größe:

a) 5'Ende des 3d^{rif} Gens (Fig. 9) näher zur *Eco*RI-Stelle von pUC8:

848 bp
1281 bp
2694 bp

b) 5'Ende des 3d^{rif} Gens näher zur *Hind*III-Stelle von pUC8:

56 bp
848 bp
3919 bp

Eine Agarose-Gelelektrophorese des hydrolysierten Plasmides zeigte Fragmente in den Größen wie im Fall b) (Fig. 11A). $3d^{rif}$ ist in pUC8 also so orientiert, daß beide Leserahmen nicht unter der Kontrolle des *lac*-Promoters stehen.

***AccI*-Hydrolyse von $3d^{rif}$**

Auf dem $3d^{rif}$ -Fragment (2145 bp) finden sich bei Position 201 und 362 zwei *AccI*-Stellen, die bei finalem Restriktionsabbau Fragmente mit den Größen 1783, 201 und 161 bp liefern. Für die Isolierung des großen 1783 bp Fragmentes wurde von dem Plasmid pUC8 (Vieira und Messing 1982, Yanish-Perron *et al.* 1985), welches das in die *Bam*HI Stelle einklonierte $3d^{rif}$ -Fragment enthielt, ausgegangen (Fig. 10). Schneidet man dieses Plasmid mit *Eco*RI und *AccI*, so erhält man die oben angegebenen Fragmente; lediglich das 1783 bp-Fragment ist 5' um 10 bp aus dem Polylinker des Vektors pUC8 verlängert. Dieser DNA-Abschnitt, der auch die Deletion von vier Guaninresten als Mutation gegenüber dem Wildtyp enthält, wurde über DEAE-Cellulose Filter wie im Methodenteil beschrieben isoliert und durch Ethanolpräzipitation konzentriert.

Partielle *AccI*-Hydrolyse des WT- α Fragmentes

Um den isolierten Genabschnitt, der die Nukleotide 362-2145 des ursprünglichen $3d^{rif}$ Fragmentes enthält, zu einer der Mutanten äquivalenten Sequenz ergänzen zu können, ist es nötig aus dem Wildtypklon den 5'-terminalen Bereich von 0-362 bp zu isolieren. Dazu wurde das WT- α Fragment 15 min mit *AccI* partiell hydrolysiert und das zusätzlich zum final resultierenden 201 bp Fragment entstandene Intermediärprodukt mit 362 bp (Fig. 11B) über DEAE-Cellulosefilter aus einem Agarosegel isoliert und aufgereinigt wie oben.

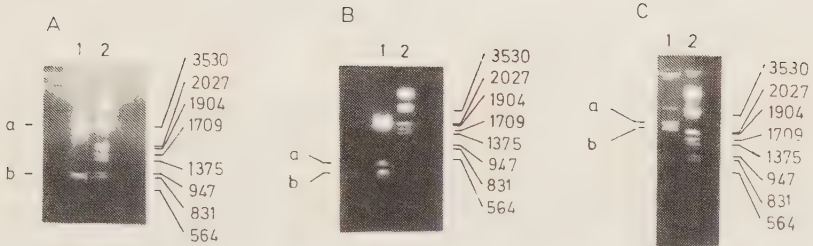


Fig. 11: Restriktionsanalyse von pUC8-3d^{rif}, -WT- α und pBS1

A Orientierung des 3d^{rif} Fragmentes in pUC8

1 μ g DNA wurde mit *Hind*III gespalten und auf einem 0.8 %igen Agarosegel aufgetrennt (Spur 1).

a: 3931 bp Fragment

b: 848 bp Fragment

B Partielle *Acc*I Hydrolyse des WT- α Fragmentes

4 μ g des Fragmentes wurden mit *Acc*I gespalten und auf einem 0.8 %igen Agarosegel aufgetrennt (Spur 1).

a: 362 bp Fragment

b: 201 bp Fragment

Die im Bereich von 3100 bp bis 1700 bp sichtbare starke Bande enthält unverdaute Anteile sowie größere Produkte des partiellen Abbaus (die Fragmente mit 1787 bp, 1948 bp, 2881 bp und 3042 bp). Das ebenfalls resultierende 161 bp Fragment ist auf Grund seiner geringen Größe hier nicht zu sehen.

C *Eco*RI/*Bam*HI Hydrolyse von pBS1

1 μ g DNA wurde mit den Enzymen *Eco*RI und *Bam*HI gespalten und auf einem 0.8 %igen Agarosegel aufgetrennt (Spur 1).

a: linearisierter pUC12 Anteil

b: rekombinantes Insert

Die ebenfalls schwach sichtbare 4831 bp Bande entspricht noch unhydrolysierter DNA.

In allen drei Teildarstellungen sind jeweils in Spur 2 4 μ g einer mit *Eco*RI und *Hind*III hydrolysierten lambda-DNA als Größenvergleich aufgetragen.

Ligation und Transformation

Die beiden oben isolierten Fragmente (1793 bp *AccI*/*EcoRI* und 362 bp *BamHI*/*AccI*) wurden nochmals gelelektrophoretisch gereinigt und nach einer Ethanol-Präzipitation der aus dem Gel eluierten Banden in molarem 1:1 Verhältnis (Gesamt-DNA-Gehalt des Ligationsansatzes: 50 ng) über ihre kompatiblen 5'-überhängenden *AccI*-Arme bei 14°C 12h ligiert. Eine Ligation über die "falschen" Enden ist ausgeschlossen, da diese zueinander nicht antiparallel komplementär sind. Die aus der Ligasereaktion resultierende rekombinante DNA war identisch mit dem 3d^{rif}-Fragment bis auf den Bereich von 0 bis 362 bp, der durch die entsprechende Sequenz des WT- α Klons ersetzt war. Durch diesen Austausch wurde die Mutation bei Nukleotid 227 eliminiert. Das 5'*BamHI*- und 3'*EcoRI*-überhängende Enden aufweisende rekombinante Fragment wurde in einen mit *EcoRI* und *BamHI* linearisierten pUC12 Vektor ligiert. Die nach Transformation in kompetente JM83 Zellen erhaltenen Bakterienkolonien wurden auf Ampicillin-haltigen LB-Platten auf inaktive β -Galactosidase hin selektioniert. In Schnell-aufschlüssen wurde das transformierte Plasmid pBS1 aus weißen, also positiven Klonen isoliert und die Insertion durch Hydrolyse mit *EcoRI* und *BamHI* bei anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung der Restriktionsprodukte nachgewiesen (Fig. 11C).

Resistenzverhalten des rekombinanten Klons

Der Einfluß des Mutationsverlustes bei Position 227 wurde durch Selektion auf Agarplatten mit unterschiedlicher Rifampicin-konzentration untersucht (Tab.1). Dazu wurden die Hybridklone auf Ampicillinplatten ausgestrichen, auf Rifampicin haltige Platten übergepickt und 12 bzw. 24h bei 37°C bebrütet. Als Kontrolle dienten 3d^{rif}-Klone und WT- α Kolonien, die derselben Selektion unterzogen wurden.

Tab.1: Wachstumsvergleich des Wildtypstammes mit verschiedenen mutierten Stämmen

Bakterien, die das in pUC8 Vektoren WT- α bzw. 3d^{rif} Fragment enthielten, sowie mit pBS1 transformierte Zellen (jeweils JM83) wurden auf LB-Platten unterschiedlicher Rifampicinkonzentration gepickt und das Wachstum bei 37°C nach 14h bzw. 24h untersucht.

++ sehr gutes Wachstum

+ gutes Wachstum

- kein Wachstum

[Rifampicin] $\mu\text{g/ml}$	WT- α	3d ^{rif}	pBS1	WT- α	3d ^{rif}	pBS1
	in pUC8			in pUC8		
	14h			24h		
0	++	++	++	++	++	++
2	+	++	++	+	++	++
5	-	++	++	-	++	++
10	-	++	++	-	++	++
30	-	++	++	-	++	++
60	-	+	+	-	++	++
90	-	-	-	-	+	+
120	-	-	-	-	-	-

Wie aus Tab. 1 hervorgeht, unterscheidet sich das Wachstum der Bakterien, welche die neu rekombinierte DNA enthalten, nicht von dem des 3d^{rif}-Klons. Die minimale Hemmstoffkonzentration beträgt in beiden Fällen 100 µg/ml Rifampicin. Der WT- α Klon zeigt dagegen die erwartete Sensitivität gegenüber dem Antibiotikum wie bei Heinrich (1987) beschrieben. Diese Versuche belegen eindeutig, daß eine Mutation des Nukleotids 27 von G zu A keinerlei Einfluß auf das Resistenzverhalten gehabt haben könnte. Der Grund für diese Resistenz ist allein in der Deletion der vier Guaninreste zu suchen.

Einfluß von Leserahmen I auf die Resistenz

Da die deletierten vier Guaninreste innerhalb des offenen Leserahmens IIa liegen und dieser durch die Mutation zum Leserahmen IIb verlängert wird, während der 5'davor liegende Leserahmen I im 3d^{rif} und WT- α Fragment identisch ist, sollte ein Protein, daß von Leserahmen I kodiert wird, für sich alleine nicht zur Resistenz führen. Um diese Folgerung zu bestätigen, wurde durch Hydrolyse mit der Endonuklease *DraI* das 3d^{rif} Fragment in zwei DNA-Abschnitte geteilt, die jeder einen der beiden Leserahmen tragen. *DraI* spaltet bei Position 647 und 695 und erzeugt dadurch DNA-Stücke der Größen 1450, 647 und 48 bp (Fig. 9). Das 647 bp Fragment enthält den kleinen Leserahmen und den kompletten 5'-terminalen Bereich von 3d^{rif}. Dieses Fragment wurde nach Auftrennung der Hydrolyseprodukte auf einem Agarosegel isoliert und gereinigt. Anschließend konnte es in einen mit den Restriktionsendonukleasen *BamHI* und *SmaI* linearisierten Vektor pUC19 kloniert und in kompetente JM83 Zellen transformiert werden. Die Transformanden wurden auf ihr Wachstum in Gegenwart von Ampicillin und auf die Eigenschaft, kein α -Peptid mehr zu synthetisieren, selektioniert. Durch Überpicken der erhaltenen weißen Klone auf Rifampicin haltige LB-Platten mit unterschiedlicher Antibiotikumkonzentration sollte die Rifampicinsensitivität untersucht werden.

Kein einziger der getesteten Klone war nach 16stündiger Inkubation bei 37°C fähig auf einer höheren Rifampicin-konzentration zu wachsen als die zur Kontrolle gleich behandelten Wildtyp *E. coli*-Stämme (Tab. 2). Daraus geht eindeutig hervor, daß das 647 bp Fragment beziehungsweise das darauf kodierende Protein alleine nicht in der Lage ist, auf irgendeine Art und Weise Rifampicinresistenz zu vermitteln. Dieser Befund steht in Übereinstimmung zu den oben geäußerten Vermutungen. Weiterhin offen bleibt allerdings die Frage, ob dieses Protein etwa durch Zusammenwirken mit anderen Proteinen die Antibiotikum-sensitivität herabsetzt.

Tab.2: Beeinflussung des Wachstumsverhaltens durch Expression des kleinen Leserahmens I

JM83 Zellen, die mit dem das 647 bp *Bam*HI/*Dra*I Fragment enthaltenden Vektor pUC19 transformiert waren, wurden auf LB-Platten unterschiedlicher Rifampicinkonzentration gepickt und ihr Wachstum mit dem nicht transformierter JM83 Bakterien verglichen.

++ sehr gutes Wachstum

+ gutes Wachstum

- kein Wachstum

[Rifampicin] µg/ml	JM83	pUC19 mit 647bp-Frag. in JM83
0	++	++
2	+	+
5	-	-
20	-	-
50	-	-

Abhängigkeit der Resistenz von Mutationen im 3d^{rif} Fragment

Zur näheren Untersuchung des Sensitivitätsverlustes gegenüber Rifampicin sollte der 3d^{rif} DNA-Abschnitt auf verschiedene Art und Weise mutiert werden. So wurden der 5'- und 3'-Terminus um kodierende und nicht kodierende Sequenzen verkürzt. Außerdem wurde ein Stopcodon in Leserahmen IIb eingeführt, welches die Expression der letzten 67 Codons verhindert. Ebenso wurde Leserahmen IIb alleine in Vektoren kloniert. Alle Mutationen des 3d^{rif} Gens wurden auf ihre Fähigkeit, Resistenz zu induzieren, getestet.

Deletion von 362 bp am 5'Ende

Das 2145 bp *Bam*HI Fragment wurde mit *Acc*I hydrolysiert (Fig. 9), wobei DNA-Stücke in den Größen 1783 bp, 201 bp und 161 bp entstanden (Fig. 12A). Nach Isolierung und Reinigung des 1783 bp Fragmentes wurden dessen am 3'Terminus überhängenden *Bam*HI-Enden und am 5'Terminus überhängenden *Acc*I Enden mit T4-DNA-Polymerase (Richardson und Kornberg 1964) unter Zugabe der vier Nukleotide dATP, dCTP, dGTP und dTTP aufgefüllt, so daß das Fragment nun zwei glatte Enden aufwies. Dieser Schritt war nötig, da die *Acc*I-Stelle im pUC Vektor (GTCGAC) nicht kompatibel mit der *Acc*I-Schnittstelle im 3d^{rif} Fragment (GTCTAC) ist und somit eine direkte Klonierung nicht möglich war. Linearisiert man pUC8 oder pUC12 mit *Sma*I, so besitzt der geschnittene Vektor ebenfalls zwei glatte Enden, zwischen welche das 1783 bp Fragment ligiert wurde. Nach Transformation in kompetente JM83 Zellen erfolgte eine Selektion auf Ampicillinresistenz und α -Komplementation.

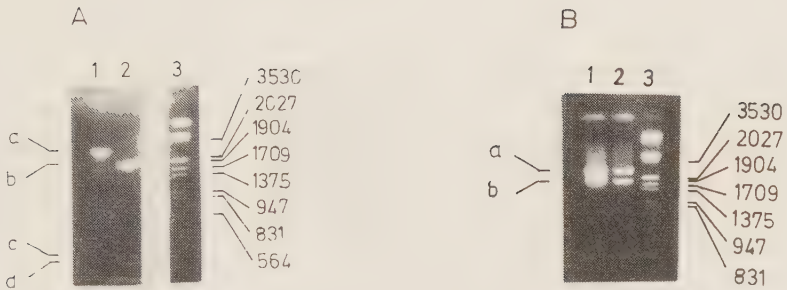


Fig 12: Restriktionsanalysen zur Gewinnung und zum Klonierungsnachweis des 1783 bp *AccI*/*Bam*HI Fragmentes

- A** *AccI* Hydrolyse des 2145 bp *Bam*HI Fragmentes
 Spur 1: 2 µg eines mit *Sma*I linearisierten Vektors pUC12 (Bande a)
 Spur 2: 2 µg des 3d¹¹f Fragmentes wurden mit *AccI* gespalten.

Bande b: 1783 bp Fragment
 Bande c: 201 bp Fragment
 Bande d: 161 bp Fragment

- B** *Eco*RI/*Bam*HI Hydrolyse von pUC12 mit insertiertem 1783 bp *AccI*/*Bam*HI Fragment

Je 2 µg rekombinanten Plasmides aus 2 positiven Klonen wurden mit *Eco*RI und *Bam*HI gespalten (Spuren 1 und 2).

Bande a: linearisierter Vektor pUC12
 Bande b: Insert mit 1800 bp (17 bp davon stammen aus dem Polylinker von pUC12)

Die Auftrennung erfolgte in beiden Fällen auf einem 0.8 %igem Agarosegel. Als Größenvergleich wurden jeweils 4 µg mit *Eco*RI und *Bam*HI hydrolysierte *lambda*-DNA aufgetragen (Spur 3).

Die so erhaltenen weißen Klone wurden angereichert, die darin enthaltene Plasmid DNA in Schnellaufschlüssen isoliert, gereinigt und mit den Nukleasen *EcoRI* und *BamHI* verdaut wie unter Methoden beschrieben. Durch die anschließende elektrophoretische Auftrennung der Restriktionsprodukte auf einem Agarosegel konnte das wieder ausgeschnittene Fragment in der erwarteten Größe sowie der linearisierte Vektor sichtbar gemacht werden (Fig. 12B). Die rekombinante Plasmide enthaltenden Bakterien sollten auf ihre Rifampicinsensitivität getestet werden. Durch Überpicken auf LB-Platten, die Rifampicin in verschiedenen Konzentrationen enthielten, konnte die minimale Hemmstoffkonzentration bei 37°C auf ca. 20 µg/ml Antibiotikum festgelegt werden. Die Wachstumszeiten betrugen auch hier 12 bzw. 24 h. Durch den Verlust des 362 bp 5'terminalen Bereiches und damit der Zerstörung von Leserahmen I des 3d^{rif} Fragmentes wurde also die Rifampicintoleranz der Bakterien drastisch abgesenkt, sie liegt jedoch immer noch deutlich über derjenigen des WT-α Stammes.

Deletion von 695 bp am 5'Ende

Eine noch umfassendere Deletion des 5'Bereiches ist durch Hydrolyse des 3d^{rif} Fragmentes mit *DraI* möglich. Dieses Enzym schneidet bei den Positionen 647 und 695 und erzeugt somit Bruchstücke in den Längen 1450 bp, 647 bp und 48 bp (Fig. 9). Da die *DraI* Spaltung von DNA zu glatten Enden führt, ist eine Klonierung in den mit *BamHI* und *SmaI* linearisierten Vektor pUC12 leicht möglich. Dazu wurde das 1450 bp Fragment aus einem Agarosegel über DEAE-Cellulosemembranen isoliert und in einem nach Dugaiczky (1975) berechnetem Molverhältnis in den Vektor ligiert (Fig. 13). Die Selektion auf rekombinante Plasmide und der Test auf Rifampicinresistenz erfolgte wie oben. Auch hier findet man eine kräftig reduzierte minimale Hemmstoffkonzentration von 15-20 µg/ml (bei 37°C, 12h Wachstumsdauer).

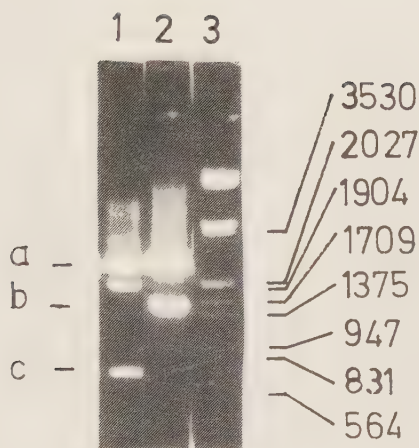


Fig. 13: *Bam*HI/*Eco*RI Hydrolyse von pUC12 mit insertiertem 1450 bp *Dra*I/*Bam*HI Fragment

Je 4 μ g DNA wurden mit *Bam*HI und *Eco*RI gespalten und auf einem 0.8 %igem Agarosegel analysiert (Spur 2).

a: linearisierter Vektor pUC12

b: 1450 bp Fragment

c: 647 bp Fragment

zum Vergleich:

Spur 1: pUC12 DNA, in die das 647 bp Fragment aus der *Dra*I Spaltung von 3d^{ri}f kloniert ist

Spur 3: als Größenvergleich aufgetrennte *Eco*RI/*Hind*III Hydrolyseprodukte von lambda-DNA

Die Deletion des gesamten Leserahmens I führt also zu keiner deutlich unterschiedlichen Sensitivität gegenüber derjenigen bei Verlust von nur 362 bp. Dies bedeutet, daß die verbliebene Resistenz, die bei beiden 5'-Deletionen annähernd gleich ist, nur von dem 1450 bp Fragment induziert wird. Der Bereich von 362-695 bp für sich betrachtet scheint von keiner Bedeutung für das Resistenzphänomen zu sein.

Deletion von 61 bp am 3'Ende

Das 3d^{rif} Fragment besitzt bei Nukleotid 2084 eine *Cla*I Schnittstelle. Die Hydrolyse mit diesem Enzym führt zu zwei DNA-Stücken in den Längen 2084 bp und 61 bp. Das aus einem Agarosegel isolierte 2084 bp Fragment wurde mit T4 DNA-Polymerase an den überhängenden Enden aufgefüllt, da der zum Klonieren gewählte Vektor pUC19 keine *Cla*I Schnittstelle besitzt. Diese nun glatte Enden aufweisende DNA wurde in mit *Sma*I linearisierten Vektor pUC19 insertiert. Selektioniert wurde wiederum auf Ampicillinresistenz und α -Komplementation. Durch Agarosegelelektrophorese von mit *Eco*RI und *Bam*HI verdauten Schnellaufschlüssen der rekombinanten, weißen Klone ist deutlich die Verkürzung des Inserts um 61 bp sichtbar zu machen (Fig. 14). Der Test auf Rifampicinempfindlichkeit zeigt keinerlei Unterschied zum Wachstumsverhalten der 3d^{rif} Klone. Eine Deletion des 3'-Endes hat also keinerlei Einfluß auf die Sensitivität der RNA-Polymerase. Da bei der Verkürzung kein Leserahmen betroffen ist, die kodierten Proteine also beide im selben Maße wie im 3d^{rif} Klon exprimiert werden könnten, kommt man sehr leicht zur Folgerung, daß die Resistenz wirklich an die Expression der beiden Proteine (auf alle Fälle aber an die des zweiten) gebunden ist. Wenn dies der Fall ist, müßte eine Veränderung des Leserahmens IIb zu einer Veränderung des Verhaltens gegenüber dem Antibiotikum führen.

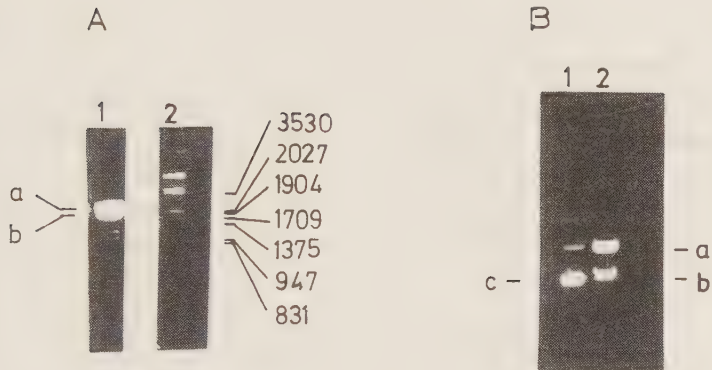


Fig. 14: *Cla*I Hydrolyse von 3d^{rif}

A 2 µg pUC19 DNA mit dem durch *Cla*I Spaltung verkürzten 3d^{rif} Gen wurden mit *Eco*RI/*Bam*HI hydrolysiert und auf einem 0.8 %igem Agarosegel aufgetrennt (Spur 1).

a: pUC19 DNA

b: verkürztes Insert

Spur 2 enthält als Größenvergleich 2 µg einer mit *Eco*RI und *Hind*III gespaltenen lambda-DNA.

Da eine Größenzuordnung schlecht möglich war, wurde Bande b über DEAE-Cellulose Filter isoliert und nochmals elektrophoretisch analysiert (Teilbild B).

B Spur 1: Bande c entspricht der isolierten Bande b aus A

Spur 2: Als Vergleich wurde pUC8-3d^{rif} mit *Bam*HI gespalten. Deutlich sichtbar ist die im Vergleich zu Bande c in Spur 1 geringere Mobilität des ursprünglichen 3d^{rif} Fragmentes (b).

Einführung eines Stop-Codons in Leserahmen I Ib

Das 3d^{rif} Fragment besitzt bei Nukleotid 1874 eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Bst*EII (GGTNACC), die sich 207 bp vom 3'-Terminus des Leserahmens I Ib befindet. Hydrolysiert man den Vektor pUC8, der das 3d^{rif} Gen als Insert trägt, mit *Bst*EII, so entsteht ein lineares DNA-Stück mit 5'-überhängenden Enden, da pUC8 selbst keine *Bst*EII Schnittstellen aufweist; diese Enden wurden in einer T4-DNA-Polymerasereaktion zu glatten Enden ergänzt. Verknüpft man beide Enden mit Ligase, so erhält man das rezirkularisierte Plasmid zurück, das nun um 5 bp der Sequenz GTGAC in der *Bst*EII Stelle verlängert ist. Diese Insertion hat ein neues Stopcodon TGA in Leserahmen I Ib zur Folge, der das potentielle Protein um 67 Aminosäuren verkürzt (Fig. 15). Die Richtigkeit der Insertion wurde durch partielle Sequenzanalyse des Plasmids belegt (Fig. 16). Die Rifampicinsensitivität der mit diesem Vektorkonstrukt transformierten JMB3 Zellen wurde wie üblich getestet. Auch hier ist eine eindeutige Reduktion der minimalen Hemmstoffkonzentration festzustellen. Jedoch wird sie nur auf $\approx 40 \mu\text{g/ml}$ abgesenkt (gemessen nach Wachstum über 12h bei 37°C auf LB-Agar), einen Wert, der markant über demjenigen bei Deletionen am 5'-Ende liegt. Der C-Terminus des Proteins I Ib scheint für die Funktion als Resistenzvermittler nicht so relevant zu sein.

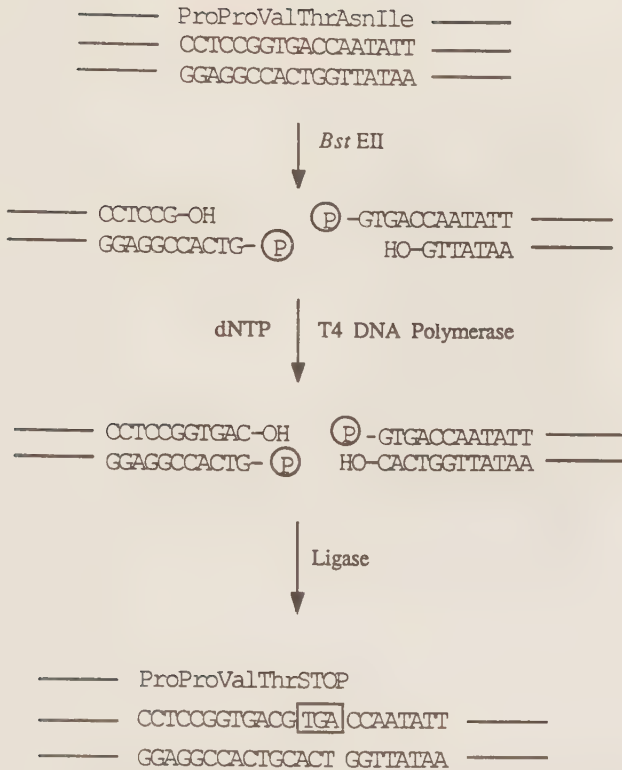


Fig. 15: Mutation in der *Bst*EII Stelle

Durch Endauffüllung der geschnittenen DNA und Religation erfolgt eine Änderung des Leserahmens IIb mit einem daraus resultierenden Stopcodon.



Fig. 16: Ausschnitt aus einer Gelchromatographie zur Sequenzanalyse der mutierten *Bst*EII Stelle

Sequenziert wurde pUC8-3d^{ri}f DNA nach der Mutation in der *Bst*EII Stelle.

Als Primer wurde der 17-mer reverse sequencing pUC primer (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') verwendet, da es ausreichend war, 300 Basen in das 3'-Ende des Inserts zu lesen. Die Sequenzierung wurde nach dem modifizierten Dideoxy-Kettenabbruchverfahren (Heinrich 1987, Sanger *et al.* 1977) direkt am Plasmid durchgeführt.

Die angegebene Sequenz wurde aus dem Gegenstrang des Inserts gelesen und führt nach Umschreiben in den kodierenden Strang zu der in Fig. 15 gegebenen, mutierten Sequenz.

Wachstumsverhalten der 5'- und 3'-Mutanten

Eine wesentlich genauere Aussage über die Rifampicinsensitivität der erzeugten Mutanten läßt sich durch Aufnahme von Wachstumskurven treffen. Hierzu wurden die zu untersuchenden Bakterienkolonien in 50 ml Submerskulturen gezogen, die mit je 50 µl der entsprechenden Übernachtskulturen angeimpft worden waren. Nach 2 h Wachstum bei 37°C wurde Rifampicin in unterschiedlichen Konzentrationen zugegeben und die weitere Vermehrung der Bakterien durch halbstündliche Messung der optischen Dichte bei 600 nm bestimmt. Aus Fig. 17 geht deutlich hervor, daß das Wachstum eines *E. coli*-Wildtypstammes gegenüber dem eines 3d^{rif}-Stammes, der noch bei 80 µg/ml Rifampicin keinerlei Inhibierung zeigt, drastisch reduziert ist wie schon bei Heinrich (1987) beschrieben. Der Stamm, der das durch *Cla*I Hydrolyse am 3'Ende verkürzte 3d^{rif} Fragment trägt, zeigt auch in diesem Versuch ein zum 3d^{rif}-Stamm identisches Verhalten, wodurch vorherige Versuche der Inkubation auf Rifampicinplatten bestätigt werden konnten. Ebenso kein Unterschied besteht zum Stamm mit dem rekombinanten Plasmid pBS1, weshalb man auch hier davon ausgehen kann, daß eine mögliche Mutation bei 227 bp keinerlei Bedeutung für die Resistenz hat. Eine Analyse des Wachstums von Stämmen, denen der 5'-terminale Bereich fehlt (Fig. 18), bestätigt die vorher gefundene deutlich reduzierte Resistenz gegenüber dem Antibiotikum. Bereits bei 10 µg/ml Rifampicin läßt sich eine leichte Hemmung des Wachstums feststellen, die bei 20 µg/ml etwa den Grad der Inhibierung erreicht, der einer Rifampicinkonzentration von 100 µg/ml beim 3d^{rif}-Stamm äquivalent ist. Die Wachstumsgeschwindigkeit aller untersuchten Klone unterscheidet sich bei gleicher, unterhalb der absolut hemmenden Dosis liegender Antibiotikumkanzenztration in keinem Fall, obwohl Tropschug (1981) und Kollenda (1981) von einer Verlangsamung bei Rifampicinaufnahmemutanten sprechen.

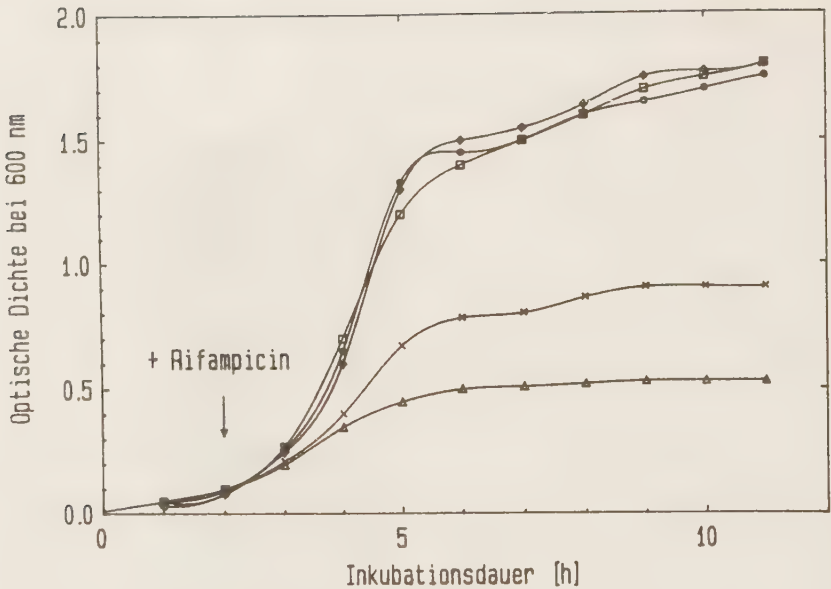


Fig. 17: Wachstumsversuche mit den erzeugten Mutanten

Mit je 50 μ l Übernachtskultur angeimpfte 50 ml Submerskulturen wurden nach 2h Wachstum bei 37°C mit 80 μ g/ml Rifampicin versetzt und die OD₆₀₀ stündlich bestimmt.

Die eingesetzten JM83 Zellen waren mit folgenden Plasmiden transformiert:

- ◆ : pUC8-3d^{rif}
- ◻ : pBS1
- : pUC19 mit *Cla*I verkürztem 3d^{rif} Insert
- × : pUC12 mit 1450 bp *Dra*I/*Bam*HI Fragment
- △ : pUC8 mit WT- α Fragment

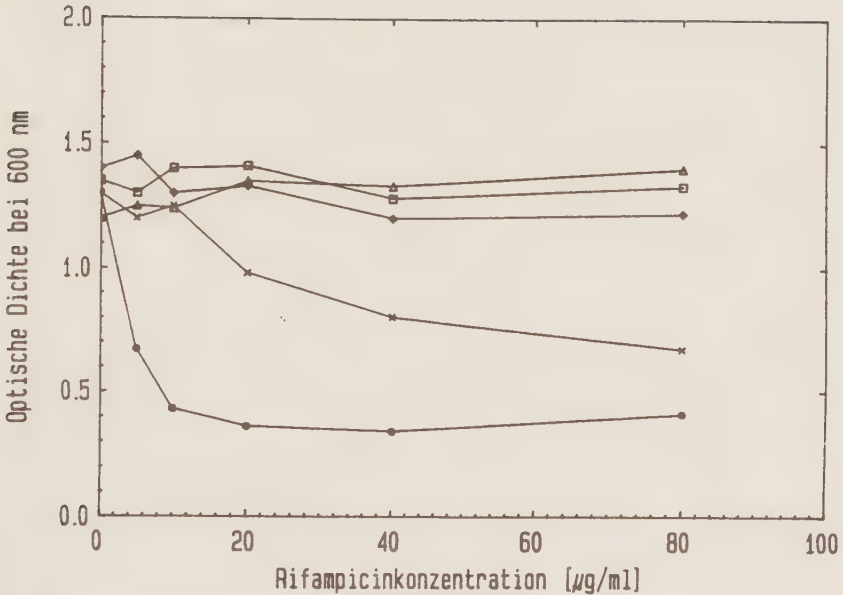


Fig. 18: Abhängigkeit des Wachstums von der Rifampicin-konzentration

Die Durchführung entspricht der in der Legende zu Fig. 17 gegebenen. Lediglich die Rifampicinkonzentration wurde variiert wie auf der Abszisse angegeben. Das Wachstum bei 37°C wurde in jedem Fall 8h nach Rifampicinzugabe bestimmt.

- ◇ : pUC8-3d^{rif}
- △ : pBS1
- : pUC19 mit *Cla*I verkürztem 3d^{rif} Insert
- × : pUC12 mit 1450 bp *Dra*I/*Bam*HI Fragment
- : pUC8 mit WT-α Fragment

Versuche im T7-Expressionssystem

In den bisher dargelegten Experimenten erhärtete sich die Vermutung, daß vom 3drif-Gen kodierte Proteine als Ursache für die Resistenz gegenüber Rifampicin anzusehen sind. Eine direkte Expression dieses *Bam*HI-DNA-Fragmentes sollte über die Möglichkeit Proteine zu synthetisieren, deren Zusammensetzung auf dem klonierten Gen kodiert ist, Aufschluß geben. Tabor *et al.* entwickelten 1985 ein Vektorensystem, mit welchem beliebige kodierende Leserahmen zur Expression gebracht werden können (Tabor und Richardson 1985). Dabei handelt es sich um ein 2-Plasmid-System mit den Vektoren pGP1-2 und pT7-3 (-4, -5, -6). Das Plasmid pGP1-2 (Fig. 19) trägt das Gen für die RNA-Polymerase des Phagen T7 (Gen1), dessen Transkription durch den durch Temperaturerhöhung von 30°C auf 42°C induzierbaren lambda-Promotor P_L kontrolliert wird. Um auf die Anwesenheit dieses Plasmids in transformierten Bakterien selektionieren zu können, trägt es das Gen für ein Kanamycinresistenz vermittelndes Protein. Als Replicon dient der Replikationsursprung des kryptischen Plasmides Pl5A aus *E. coli* 15 (Chang und Cohen 1978). Der Vektor pT7-3 (Fig. 20) besitzt hinter dem Promotor für die T7-RNA-Polymerase (T7Q10-Promotor) den Polylinkerbereich aus pUC8, in welchem die zu exprimierenden DNA-Fragmente nach den üblichen Methoden leicht einkloniert werden können. Zur Selektion dient das Gen für beta-Lactamase (Ap^r); als Replicon dient der ColEI Ursprung aus pMB1 (Sutcliffe 1979), der mit dem Pl5A Ursprung kompatibel ist. Eine Induktion des P_L-Promotors auf pGP1-2 sollte eine Steigerung der Ausbeute an dem in pT7-3 klonierten Protein zur Folge haben, die bei 20-30% des gesamten zellulären Proteinanteils liegt. Davon ist allerdings nur ein Drittel ohne geeignetes Detergens wasserlöslich (Tabor und Richardson 1985). Um die Expression der insertierten DNA nachweisen zu können, wurde folgendes Verfahren angewandt: Bakterien, die beide Plasmide tragen, läßt man bei 30°C wachsen. Bei dieser Temperatur wird der lambda-Promotor durch den temperatursensitiven lambda-Repressor cI857 reprimiert.

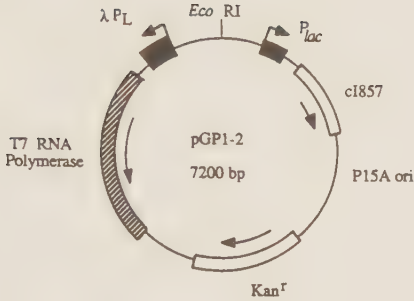


Fig. 19: Plasmid pGP1-2

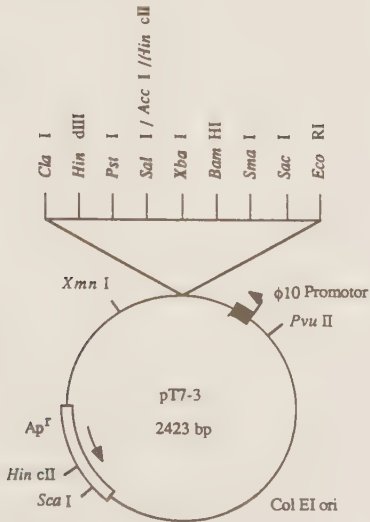


Fig. 20: Plasmid pT7-3

Das Plasmid pT7-4 ist identisch zu pT7-3 bis auf die inverse Orientierung des Polylinkers.

Die Plasmide pT7-5 und pT7-6 entsprechen den Plasmiden pT7-3 bzw. pT7-4; lediglich das Gen für die β -Lactamase (Ap^r) besitzt eine andere Orientierung.

$\Phi 10$: Promotor für T7 RNA Polymerase

Transkription findet allein durch die RNA-Polymerase von *E. coli* statt. Erhöht man nun die Temperatur auf 42°C und reaktiviert dadurch den lambda-Promotor, so wird T7 RNA-Polymerase synthetisiert. Diese Temperaturerhöhung sollte nicht zu lange aufrecht erhalten werden, da die T7 Polymerase für *E. coli* *trx*⁺-Stämme toxisch ist und daher die Konzentration an diesem Enzym möglichst gering gehalten werden muß (Tabor und Richardson 1985). Hemmt man nun mit Rifampicin die *E. coli* RNA-Polymerase (Chamberlin 1976), so wird nur noch diejenige RNA synthetisiert, deren DNA hinter den T7 Promotor insertiert ist. Die Expression ausschließlich dieser RNA läßt sich durch Zugabe von ³⁵S-markiertem Methionin und anschließender Polyacrylamid-Gelelektrophorese in Gegenwart von Natrium-Dodecylsulfat nachweisen, da auf Grund der geringen Halbwertszeit von mRNA in der Zelle zu diesem Zeitpunkt nur noch vom Insert transkribierte mRNA vorliegt. Auf dem resultierenden Autoradiogramm sollten als Banden nur noch die Proteine zu sehen sein, deren Gene von der T7 RNA-Polymerase transkribiert worden sind.

Klonierung von 3d^{rif} in pT7-4

Eine Klonierung des *Bam*HI-Fragmentes in das Expressionsplasmid pT7-4 (Fig. 20) sollte eine Translation der auf dem 3d^{rif}-Gens befindlichen zwei Leserahmen ermöglichen. Dazu wurde der Vektor mit *Bam*HI linearisiert und durch Behandlung mit Phenol/Chloroform bei anschließender Ethanolpräzipitation gereinigt. Durch Inkubation mit alkalischer Phosphatase und einer dabei hervorgerufenen Abspaltung des 5'-Phosphatrestes wurde eine spätere Autozirkularisation verhindert. Ein unter Standardbedingungen durchgeführter Ligationsansatz mit 3d^{rif} (molares Vektor/Insert-Verhältnis 2:1) wurde in kompetente JM83 Zellen transformiert. Eine Selektion auf α -Komplementation konnte hier nicht durchgeführt werden, da dem Plasmid pT7-4 das dazu nötige *lacZ* Gen fehlt.

Statt dessen wurde nur auf Resistenz der angewachsenen Klone gegenüber Ampicillin selektioniert. Da für eine erfolgreiche induzierbare Expression unter Kontrolle des T7 ϕ 10-Promotors die korrekte Orientierung des Inserts wichtig ist, wurde in mehreren Schnellaufschlüssen gewonnene rekombinante DNA mit *Hind*III geschnitten und die Einbaurichtung der klonierten DNA wie auf Seite 63 beschrieben bestimmt. Für die weiteren Versuche waren nur Klone geeignet, in denen die Leserahmen I und IIb nicht gegenläufig zum T7 ϕ 10-Promotor waren. Mit einer Übernachtskultur eines solchen Stammes wurde 1l LB-Medium angeimpft und daraus das Vektorkonstrukt wie im Methodenteil erläutert isoliert. Bemerkenswert ist die deutlich geringere Ausbeute an Plasmid-DNA, die auf die geringere Kopienzahl des Plasmides pro Bakterium zurückzuführen ist. Die anschließende Reinigung erfolgte an einer HPLC-Anlage über eine Nucleogen DEAE-4000 Säule der Firma Diagen. Zur Qualitätsüberprüfung der isolierten DNA wurde sowohl die optische Dichte in einem Bereich von 240-280 nm gemessen als auch eine visuelle Beurteilung der Sauberkeit durch Agarose-Gelelektrophorese vorgenommen. 30 ng dieses hochgereinigten Vektors wurden in kompetente K38 Zellen transformiert, die bereits das Plasmid pGP1-2 enthielten. Selektioniert werden konnte gleichzeitig auf Wachstum in Gegenwart von Ampicillin für pT7-4 und von Kanamycin für pGP1-2.

Untersucht man die Rifampicinresistenz der positiven *E. coli* K38 Transformanden, so zeigt sich interessanterweise ein deutlicher Unterschied in der minimalen Hemmstoffkonzentration gegenüber dem rekombinanten Plasmid pT7-4 in JM83 Stämmen (JM83: 100 μ g/ml; K38: 15 μ g/ml). JM83 Stämme, die nur das Plasmid pT7-4 mit Insert besitzen, sind dagegen in gleicher Weise resistent gegenüber dem Antibiotikum wie Stämme mit pUC-Plasmiden und 3drif als Insert. Die Erhöhung der Sensitivität dürfte also nur auf den im 2-Plasmid-System verwendeten Stamm *E. coli* K38 zurückzuführen sein.

Die Möglichkeit, allein durch die Existenz des zweiten Plasmides pGP1-2 eine Herabsetzung der Resistenz zu bewirken, scheint mir sehr unwahrscheinlich. Eine Bestätigung dieser Hypothese war leider nicht möglich, da der plasmidfreie Stamm K38 nicht kurzfristig zu bekommen war. *E. coli* K38 Stämme, die das Plasmid pGP1-2 enthalten, zeigen wie zu erwarten keinerlei Resistenz gegenüber Rifampicin.

Expression des klonierten 3d^{rif}-Fragmentes

Zur Expression des klonierten DNA-Fragmentes wurde verfahren wie im Methodenteil ausführlich beschrieben. Die für die Versuche eingesetzten Bakterien wurden nach Abzentrifugation in M9-Medium bei 30°C gehalten. Durch Temperaturerhöhung auf 42°C konnte die Synthese der T7 RNA Polymerase induziert werden, wobei gleichzeitig durch Rifampicinzugabe die *E. coli* RNA Polymerase inhibiert wurde. Daraus resultierte die alleinige Expression plasmidkodierter Proteine, deren Gene hinter dem T7 Φ 10 Promotor von pT7-4 plaziert waren. Diese wurden durch einen Puls mit ³⁵S-L-Methionin radioaktiv markiert. Als Kontrollexperiment wurde in einem ansonsten gleichbleibenden Verfahren sowohl die Rifampicinzugabe als auch die Temperaturerhöhung weggelassen. Als Folge davon resultierte eine Markierung aller Proteine, deren mRNA von *E. coli* RNA-Polymerase synthetisiert worden ist. Eine weitere Kontrolle bestand darin, den radioaktiven Puls vor dem Anheben der Inkubationstemperatur durchzuführen, was zu einem Einbau von ³⁵S-Methionin in alle Proteine führte. Die selben drei Versuchsansätze wurden mit Kontrollbakterien, deren internes pT7-4 Plasmid keinerlei Insert trägt, unternommen.

Die Durchführung des Experimentes ist unter Methoden auf den Seiten 29 und 30 ausführlich beschrieben.

- A
- Spur 1: K38 Zellen mit pT7-4 ohne Insert;
radioaktiver Puls vor der Induktion
 - Spur 2: K38 Zellen mit pT7-4 ohne Insert;
ohne Rifampicin; keine Induktion
 - Spur 3: K38 Zellen mit pT7-4 ohne Insert;
induzierte Expression wie beschrieben
 - Spur 4: K38 Zellen mit in pT7-4 kloniertem 3d^{rlf} Fragment;
radioaktiver Puls vor der Induktion
 - Spur 5: K38 Zellen mit in pT7-4 kloniertem 3d^{rlf} Fragment;
ohne Rifampicin; keine Induktion
 - Spur 6: K38 Zellen mit in pT7-4 kloniertem 3d^{rlf} Fragment;
induzierte Expression wie beschrieben
- B
- Gleicher Versuch wie in Spur 6, nur wurde die Pulsdauer auf 12h erhöht.
- a: β -Lactamase-Vorläufer (Mr 31500)
b: β -Lactamase (Mr 29000)
c: Protein IIB (Mr 42000) d: Protein I (Mr 10000)

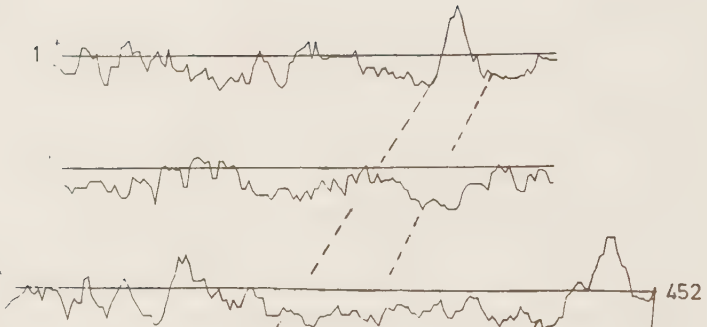
Die anschließende gelelektrophoretische Auftrennung der Reaktionsprodukte auf einem 15%igen Polyacrylamid-Gel und Autoradiographie (Fig. 21A) zeigt in den Spuren 1, 2 und 3 den Kontrollversuch mit Bakterien, die den Vektor pT7-4 ohne Insert enthalten, in den Spuren 4, 5 und 6 die Proteinbanden des Stammes mit dem rekombinanten Plasmid. Vergleicht man Spur 6 mit Spur 3, so fällt in Spur 6 sofort das Auftreten einer neuen Bande c mit der relativen Molekularmasse von 42 K auf. Die Banden a und b entsprechen der β -Lactamase (b) beziehungsweise ihrem nicht prozessierten Vorläuferprotein (a). Bande c ist allein auf die einklonierte Insert-DNA zurückzuführen und könnte das Protein repräsentieren, welches durch Leserahmen IIB kodiert wird. Die Tatsache, daß das gefundene relative Molekulargewicht von 42 K nicht mit dem hypothetischen von 48486 D übereinstimmt, bedeutet aus folgenden Gründen keine Unsicherheit in der Interpretation: Das Molekulargewicht von 42 K wird reproduzierbar in allen Expressionsstudien (auch in den später beschriebenen) gefunden. Außerdem zeigen stark hydrophobe Proteine, wie es das Protein IIB auf Grund der Aminosäurezusammensetzung ist (33.4 % des Proteins bestehen aus den hydrophoben Aminosäuren Leu, Val, Ile und Met, Heinrich 1987), im Polyacrylamid-Gel etwas erhöhte Mobilität. So wandert z.B. das tet-Protein (32.6 % Leu, Val, Ile und Met) mit einem Molekulargewicht von 42 kD wie ein Protein der scheinbaren Größe 36.5 K (Backman und Boyer 1983), 34 K (Tait und Boyer 1978) oder gar 32 K (Weiss, pers. Mitteilung) und die Lactose Permease (absolutes Molekulargewicht 46500 D) wie ein Protein der Größe 33000 D (Buchel *et al.* 1980). Weiter auffallend ist die in Spur 6 stark radioaktiv markierte Front (Bande d), die in Spur 3 nur sehr schwach zu sehen ist. Sie entspricht dem Protein von Leserahmen I mit dem Molekulargewicht von 11428 D. Eine genaue Bestimmung des relativen Molekulargewichtes war hier nicht möglich, da die Bande mit der Auftragsfront läuft.

Eine drastische Verlängerung der Pulsdauer auf 12h führt zur deutlichen Verstärkung der Bande d (Fig. 21B), deren Identität durch eine verlässliche Größenbestimmung (es ergibt sich ein scheinbares Molekulargewicht von etwa 10 K) als Produkt von Leserahmen I gesichert werden kann. Der Vorläufer der β -Lactamase (a) ist nach einer so langen Pulsdauer natürlich nicht mehr zu sehen. In den Spuren 1 und 4 sind die Ansätze aufgetragen, bei denen die Zugabe des radioaktiven Methionins bereits vor der Induktion des P_L -Promotors stattfand. Erwartungsgemäß erstreckt sich die Bandenverteilung über den gesamten Größenbereich. Jedoch ist auch hier bereits bei Vergleich der Spuren 1 mit 4 eine Intensitätssteigerung der Bande c festzustellen. Spur 2 und 5 zeigen nur diejenigen Proteine, deren mRNA von der *E. coli* RNA-Polymerase transkribiert worden sind, da bei diesen Ansätzen auf Induktion und Rifampicinzugabe verzichtet wurde. Insgesamt läßt sich sagen, daß sowohl Leserahmen I als auch Leserahmen IIb mit dem verwendeten 2-Plasmid-System zur Expression zu bringen und gezielt nachzuweisen sind.

Immunopräzipitation des 42 K Proteins

Die Identität der Bande c mit dem durch Leserahmen IIb kodierten Protein sollte in einem weiteren Experiment durch Präzipitation mit polyklonalen Antikörpern bestätigt werden. Da zur Stimulierung der Antikörpersynthese in Kaninchen das gereinigte Protein nicht zur Verfügung stand, sondern lediglich dessen Aminosäure-Sequenz bekannt war, mußte ein Bereich gefunden werden, der sich gut als antigene Determinante eignet und dann an einem Peptid-Synthesizer chemisch hergestellt werden kann. Eine Analyse der Aminosäure-Sequenz des hypothetischen Proteins IIb zeigt, wie bei Heinrich (1987) beschrieben, einen Gehalt an hydrophoben Aminosäuren (Leu, Val, Ile und Met) von 33.4%, die so auf das Protein verteilt sind, daß es an fast jeder Position hydrophobe Eigenschaften zeigt (Fig. 22).

A



B

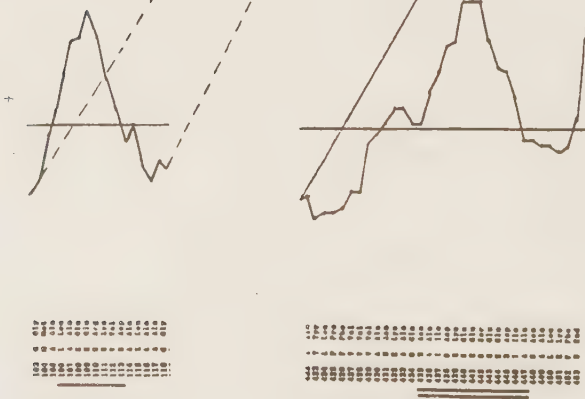


Fig. 22: Hydrophilizitätsdiagramm des Proteins IIB

Positive Werte auf der oben angegebenen Skala bedeuten hohe Hydrophilizität, negative hohe Hydrophobizität. Die im Text erwähnten hydrophilen Bereiche sind vergrößert durch Linien neben der Sequenz angedeutet, wobei die durch Doppellinien hervorgehobene Sequenz derjenigen für das gewählte Oligopeptid entspricht.

Allerdings fallen von Aminosäure 106 (Leu) bis Aminosäure 113 (Asp) und von Aminosäure 435 (Asn) bis Aminosäure 446 (Ile) zwei Bereiche mit sehr hoher sowie von Aminosäure 320 (Ala) bis Aminosäure 329 (Val) mit geringerer Hydrophilizität auf (Fig. 22). Diese drei Bereiche eignen sich prinzipiell als antigene Determinanten, da sie auf Grund ihrer Hydrophilie mit hoher Wahrscheinlichkeit in der räumlichen Proteinstruktur außen lokalisiert sind. Allgemein wird ein hydrophiler Bereich am C-Terminus von Proteinen als am besten geeignet zur Fixierung von Antikörpern angesehen (Lerner *et al.* 1981). Deshalb wurde ein 13mer Oligopeptid mit der Sequenz

NH₂-Asn-Ala-Ile-Asp-Lys-Glu-Glu-Ser-Glu-Glu-Asp-Ile-Ala-COOH

maschinell synthetisiert (Aminosäuren 435 bis 447), das nach Kopplung an das Carrierprotein KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt wurde. Vorher allerdings mußte die gewählte Sequenz sowohl mit der NBRF Protein Datenbank als auch mit der GenBank (DNA-Sequenzen) verglichen werden, um Übereinstimmungen mit bekannten Proteinen auszuschließen. Folgende Homologien wurden gefunden:

1.) in der GenBank gegen den nicht kodierenden Bereich des *E. coli* Sl0 Operons stromaufwärts der *rpsJ* und *rp1C* Gene, die für die ribosomalen Proteine Sl0 und L3 kodieren (Olins und Nomura 1981):

Glu Glu Ser Glu Glu	Peptid
GAA GAA AGC GAA GAG	<i>E. coli</i>

2.) in der NBRF Protein Datenbank gegen das hypothetische Protein A-105 aus *E. coli* (Olins und Nomura 1981):

Glu Glu Ser Glu Glu	Peptid
Glu Glu Ser Glu Glu	<i>E. coli</i>

Die gefundenen Homologien betreffen denselben Bereich auf dem *E. coli* Chromosom und sind nicht relevant, da der entsprechende Bereich auf dem S10 Operon nicht transkribiert wird (Olins und Nomura 1981).

Das aus den Kaninchen gewonnene Serum wurde in ELISA-Tests (Engvall *et al.* 1971) auf seinen Gehalt an spezifischen Antikörpern gegen das synthetische Oligopeptid getestet. Die Reinigung des Serums erfolgte über eine Epoxy-aktivierte Sepharose 6B Säule, an die das synthetische Peptid gekoppelt war. Als Elutionsmittel wurden 2 ml 3 M NaSCN eingesetzt, die im unteren Drittel der Säule, welches aus dem Molekularsieb Sephadex G-50 bestand, wieder von den Antikörpern abgetrennt wurden. Dies war auf Grund der chaotropen Eigenschaften von NaSCN nötig (Murphy *et al.* 1976). Die so erhaltene Antikörperreiche Lösung wurde ohne weitere Behandlung wie z.B. Konzentrierung verwendet. Alle hier nur kurz angerissenen Verfahren von der Präparation des Oligopeptids bis zur Reinigung des Serums sind im Methodenteil ausführlich beschrieben.

Zur Immunpräzipitation (Herrmann und Mescher 1979) wurde ein *E. coli* K38 Stamm, der die Plasmide pGPl-2 und pT7-3 mit dem insertiertem 3d^{r1f} Fragment enthielt, so behandelt wie im vorigen Kapitel beschrieben. Allerdings betrug die Wachstumszeit nach dem ³⁵S-Methionin-Puls statt 5 min zwölf Stunden bei Raumtemperatur (statt bei 30°C), um die Ausbeute an radioaktiv markiertem Protein zu erhöhen.

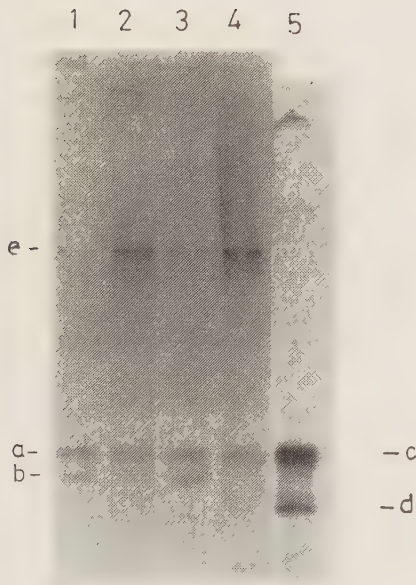


Fig. 23: Immunopräzipitation des mit $3d^{rif}$ im T7-System erhaltenen Genproduktes gefolgt von einer gelelektrophoretischen Auftrennung

Die Durchführung ist unter Methoden ausführlich beschrieben.

Für die Präzipitation wurden eingesetzt:

affinitätschromat. gereinigtes Serum		Protein A Sepharose
Spur 1	20 μ l	10 mg
Spur 2	20 μ l	30 mg
Spur 3	40 μ l	10 mg
Spur 4	40 μ l	30 mg

Spur 5: Vergleich mit den Expressionsprodukten von $3d^{rif}$ im T7-System wie in Fig.21 Spur 6 dargestellt.

a: Protein IIb (42 K)
 b: Abbauprodukt von a
 e: Übergang von Sammel- zu Trenngel

c: Protein IIb
 d: β -Lactamase

Nach Lysis und Abtrennung der Zellwände wie im Methodenteil beschrieben konnte durch aufeinanderfolgende Zugabe von gereinigtem Antiserum und Protein A Sepharose mit jeweils nachfolgender Inkubation (1 h, 4°C) der gebildete Antigen-Antikörper-Komplex fixiert und aus der Lösung separiert werden, da Protein A in der Lage ist, an die Fc-Region von Immunglobulinen zu binden (Spiegelberg 1974). Nach Erhitzen in Lämmli-Puffer zur Freisetzung gebundener Proteine erfolgte die Analyse auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel. Fig. 23 zeigt in den Spuren 1 bis 4 mit Antikörpern präzipitierte, im T7-Expressionsansatz radioaktiv markierte Proteine (jeweils Bande a), deren rel. Molekularmasse dem des Proteins IIb bzw. der Bande c entsprechen. Spur 5 zeigt zum Vergleich einen T7-Expressionsansatz wie in Fig. 21 Spur 6 dargestellt. Die ebenfalls überall nachzuweisende Bande b entspricht sehr wahrscheinlich einem Abbauprodukt des markierten Proteins. Diese Versuche belegen klar, daß das erhaltene Kaninchenserum spezifisch das Protein aus dem Expressionsansatz präzipitieren kann, dessen Gen in den Vektor pT7-3 kloniert wurde.

Immunchemischer Nachweis des 42 K Proteins im Gel ("Western Blot")

Da durch Immunpräzipitation des 42 K Proteins die Spezifität der gewonnenen Antisera eindeutig belegt werden konnte, bot sich zur schnellen Identifizierung dieses Proteins in unterschiedlichen Präparationen die sog. "Western Blot"-Technik an. Hierfür wurden die über ein normales SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennten Proteine mit einem Elektrophoretogramm auf Nitrocellulosemembranen übertragen, die anschließend durch Inkubation mit BSA vollständig abgesättigt wurden. Die Protein-Antikörper-Konjugation wurde durch Zugabe des spezifischen Antiserums erreicht, wobei durch die Gegenwart von 1% BSA der Proteingehalt im Test annähernd konstant gehalten werden konnte.

Zur Identifizierung eines Antigen-Antikörper-Komplexes auf dem Membranfilter stehen generell zwei Methoden zur Verfügung. Eine Kopplung biotinylierter Anti-Antikörper, die gegen Immunglobuline des immunisierten Tieres gerichtet sind, an die spezifisch gebundenen Immunglobuline erlaubt mit einer Bindung von Streptavidin-Peroxidase an den entstandenen Komplex auf Grund der hohen Streptavidin-Biotin Affinität eine Farbreaktion mit Diaminobenzidin als Substrat (Fig. 8). Die zweite Möglichkeit besteht in der Nutzung der Affinität von Protein A zur Fc-Region von Immunglobulinen. Bei Einsatz von mit ^{125}J markiertem Protein A läßt sich die gewünschte Bande auf dem Autoradiogramm identifizieren (Fig. 8).

Ein wie in Fig. 21 Spur 6 beschriebener T7-Expressionsansatz wurde auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und die im Gel enthaltenen Proteine durch 30minütigen Elektrobplot auf Nitrocellulosefilter (BA-85, Schleicher und Schüll) übertragen. Die anschließende Kopplung von Antiserum, biotinylierten Anti-Antikörpern und Streptavidinperoxidase durch Inkubation bei Raumtemperatur führte zu einem Komplex, der Diaminobenzidin in Gegenwart von H_2O_2 zu Dinitrobenzidin umsetzen konnte und so rotbraun angefärbt wurde. Auf diese Weise konnten alle Proteinbanden, die zur Kreuzreaktion mit dem eingesetzten Antiserum fähig waren, sichtbar gemacht werden (Fig. 24). Bande a entspricht hierbei dem 42 K Protein. Die Abhängigkeit dieser Proteinbande vom verwendeten Stamm wird in Spur 5 deutlich, auf der die Proteine von K38 Bakterien mit den insertfreien Plasmiden pT7-3 und pGP1-2 aufgetragen sind. Hier ist an der Position von Bande a eine sehr schwache Kreuzreaktion zu sehen, die wohl auf bakterielle Proteine ähnlicher Molekularmasse zurückgeführt werden muß. Dies würde auch mit der in Fig. 7 gezeigten geringen Kreuzreaktion zwischen immunreagierenden Proteinen aus Rifampicin resistenten *E. coli* JM83 mit pUC8-3d^{rif} und sensitiven *E. coli* pUC8 in Übereinstimmung stehen. Aus diesen Versuchen läßt sich eine gute, wenn auch nicht absolute Spezifität der verwendeten Antikörper folgern.

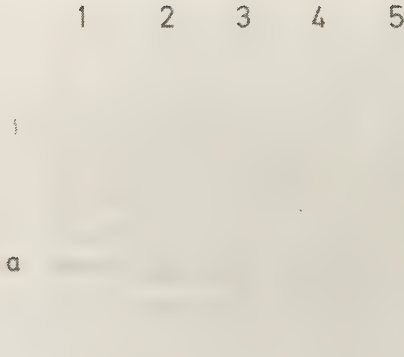


Fig. 24: Western Blot einer T7-Expression

Die Durchführung ist unter Methoden gut beschrieben.

Spuren 1 - 4: identische T7 Expressionsansätze wie in Fig.21
Spur 6

Spur 5: Kontrolle: K38 Zellen mit pT7-4 ohne Insert

a: Protein IIb wie in Fig. 23

Die knapp darunter liegende Bande entspricht einem
kreuzreagierenden Abbauprodukt von a.

b: Übergang von Sammel- zu Trenngel wie in Fig. 23 Bande c

Expression des 1783 bp *AccI/BamHI* Fragmentes

Da Stämme, die das 1783 bp *AccI/BamHI* Fragment (Fig. 9) in einem pUC Vektor enthalten, eine - wenn auch deutlich reduzierte - Rifampicinresistenz zeigen, sollte auch dieser DNA-Abschnitt in einem Expressionsexperiment zum 42 K Protein führen, vorausgesetzt, die Existenz dieses Proteins ist für die Resistenz entscheidend. Dazu wurde der Vektor pUC19, der das 1783 bp Fragment in seine *AccI*- und *BamHI*-Stellen einkloniert enthielt, mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *PstI* geschnitten und das resultierende 1808 bp Fragment in einen mit *EcoRI* und *PstI* hydrolysierten und anschließend über Agarose-Gelelektrophorese gereinigten Vektor pT7-4 (Fig. 20) kloniert. Dieses Konstrukt wurde in kompetente JM83 Zellen transformiert und die Korrektheit der Insertion durch Hydrolyse mit *EcoRI* und *PstI* mit nachfolgender gelelektrophoretischer Analyse belegt (Fig. 25). Aus Klonen, die das Insert enthielten, wurde der rekombinante Vektor isoliert, über HPLC gereinigt und in kompetente K38 Zellen, die bereits das Plasmid pGP1-2 enthielten, transformiert. Eine Selektion auf Wachstum in Gegenwart der Antibiotika Ampicillin und Kanamycin erlaubte die Kontrolle dieses Schrittes. Die so erhaltenen Klone wurden in den Tabor'schen Expressionsansatz eingesetzt. Die densitometrische Analyse des resultierenden Autoradiogramms (Fig. 26) zeigt in Spur 1 drei Banden a, b und c, wobei nach der Wanderungsgeschwindigkeit a und b der β -Lactamase bzw. der Proform entsprechen und c dem 42 K Protein IIb. Als Kontrolle ist in Spur 2 ein Expressionsansatz mit dem kompletten 3drif-Fragment als Insert in pT7-4 aufgetragen wie er in Fig. 21 Spur 6 gezeigt wurde. Bemerkenswert ist die deutlich geringere Intensität der Bande c in Spur 1, auf die in der Diskussion noch eingegangen wird.

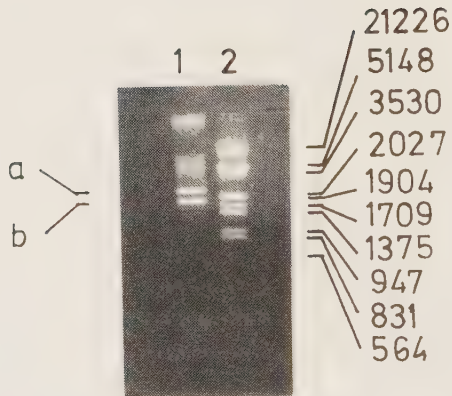


Fig. 25: Identifizierung des klonierten 1783 bp *AccI/BamHI* Fragmentes

2 µg DNA des Plasmides pT7-4 mit insertiertem 1783 bp *AccI/BamHI* Fragment von 3d^{rif} wurden mit *EcoRI* und *PstI* geschnitten und die Produkte auf einem 0.8 %igem Agarosegel analysiert (Spur 1).

a: linearisierter Vektor pT7-4

b: 1812 bp Fragment, bestehend aus dem klonierten *AccI/BamHI* Fragment und Polylinkeranteilen von pT7-4

Als Größenvergleich sind in Spur 2 4 µg einer *EcoRI/HindIII* geschnittenen lambda-DNA aufgetragen.

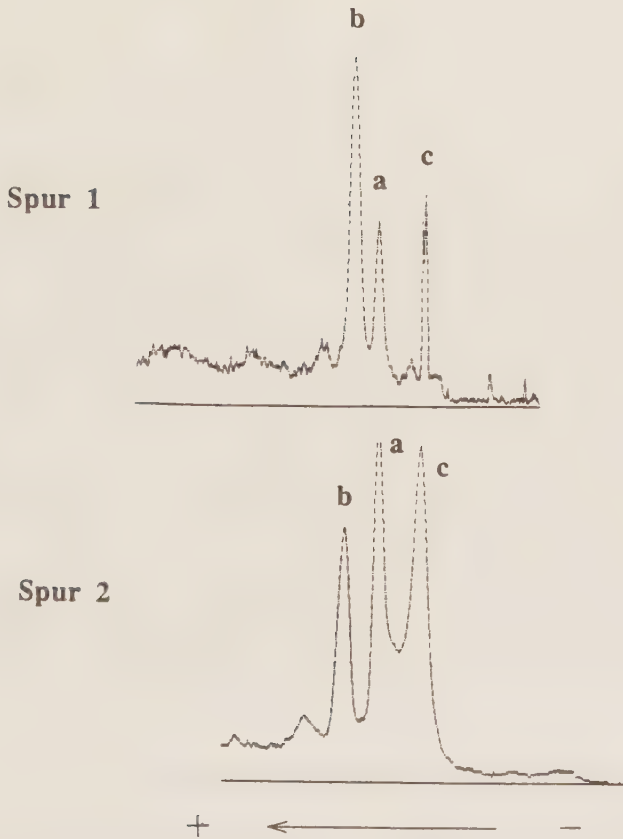


Fig. 26: Densitometrische Auswertung der gelelektrophoretischen Analyse der Expression des 1783 bp *AccI/BamHI* Fragmentes mit Hilfe des T7-Systems

Spur 1: Expressionsansatz

Spur 2: Kontrolle: Insert in pT7-4 ist $3d^{rf}$ statt dem *AccI* Fragment

a: Vorläufer der β -Lactamase
 b: β -Lactamase
 c: 42 K Protein IIb

Expression der 1450 bp bzw. 647 bp *DraI/BamHI* Fragmente

Durch Hydrolyse des 3d^{rif}-Gens mit *DraI* können die auf dem Gen liegenden Leserahmen I und IIb voneinander getrennt werden (Fig. 9), so daß Leserahmen I auf dem aus dem Schnitt resultierenden 647 bp Fragment, Leserahmen IIb auf dem 1450 bp Fragment zu liegen kommt. Es sollte also möglich sein, beide Leserahmen unabhängig voneinander spezifisch zu exprimieren. Dazu wurden die Restriktionsprodukte in die mit *BamHI* und *SmaI* linearisierten Vektoren pT7-4 (für das 1450 bp Fragment) und pT7-3 (Fig. 20) (für das 647 bp Fragment) kloniert. Das mit so manipulierten Bakterien durchgeführte Expressionsexperiment liefert interessanterweise keine radioaktiv markierten Produkte der auf den *DraI*-Fragmenten liegenden Leserahmen I und IIb (Fig. 27). Lediglich die schon beschriebenen Banden der β -Lactamase und ihres Vorläufers sind deutlich zu sehen. Auch auf diesen Befund wird ausführlich in der Diskussion eingegangen.

Expressionsversuche in verschiedenen Vektoren

Da mit dem artifiziellen Expressionssystem nach Tabor jeder Leserahmen, dessen resultierenden Proteine nicht toxisch für die Wirtszelle sind, zur Expression gebracht werden kann, ist eine Aussage über die Bedeutung der Proteinexpression für die Rifampicinresistenz in den meist verwendeten, transformierten Bakterien schwierig. Deshalb sollte versucht werden, die Proteinexpression des 3d^{rif}-Gens in verschiedenen anderen induzierbaren Vektoren in *E. coli* JM83 zu studieren. Die schon beschriebenen Versuche mit pUC Plasmiden, in die das 2145 bp *BamHI* Fragment einkloniert war, führten zur Rifampicinresistenz mit einer minimalen Hemmstoffkonzentration von 100 µg/ml.

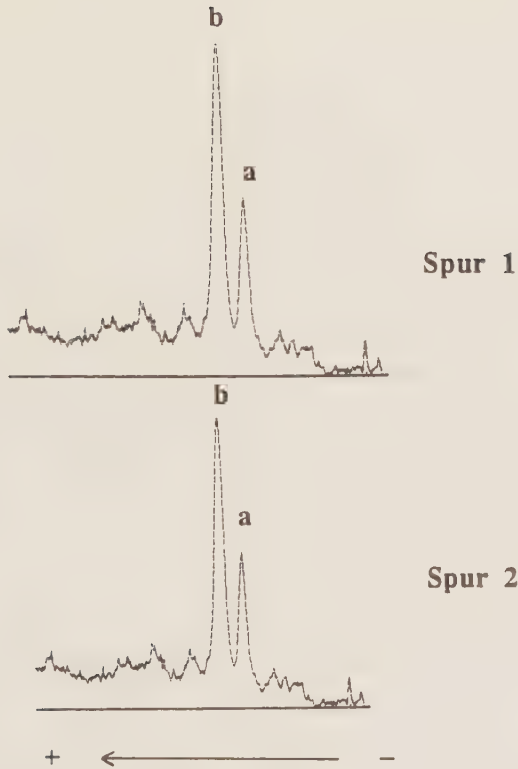


Fig. 27: Densitometrische Auswertung der gelelektrophoretischen Analyse der Expressionsversuche mit den voneinander getrennten Leserahmen I und IIb

Spur 1: Expressionsansatz unter Verwendung des 1450 bp *DraI/BamHI* Fragmentes (mit Leserahmen IIb) insertiert in pT7-4

Spur 2: Expressionsansatz unter Verwendung des 647 bp *BamHI/DraI* Fragmentes (mit Leserahmen I) insertiert in pT7-3

a: Vorläufer der β -Lactamase

b: β -Lactamase

Da die pUC Plasmide den *lac*-Promotor enthalten, der mit IPTG induzierbar ist (Müller-Hill *et al.* 1968), erfüllen sie schon eine der Bedingungen, denen ein guter Expressionsvektor genügen sollte. IPTG hat auch den großen Vorteil, zwar als Induktor zu wirken, aber kein Substrat für die β -Galactosidase zu sein. Außerdem ist pUC ein Plasmid mit hoher Kopienzahl, was eine gute mRNA-Synthese zur Folge haben müßte. Als Verbesserung gegenüber diesen Expressionsvektoren bieten sich Konstrukte mit noch stärkeren Promotoren an. Die Stärke eines Promotors wird zum großen Teil von der Qualität der Bindungsstelle für die RNA-Polymerase bestimmt. Diese erkennt die Matrizen-DNA an hochkonservierten Bereichen, der "-10"-Region und der "-35"-Region. Bei sehr starken Promotoren ist auch eine Region 43 bp entfernt vom Beginn der Transkription von Bedeutung. Der Homologiebereich 10 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts mit der kanonischen Sequenz TATAAT wurde erstmals von Pribnow 1975 und Schaller *et al.* 1975 erwähnt und deshalb auch als "Pribnow-Schaller-Box" bezeichnet. Wie die Stärke eines Promotors von diesen Sequenzen beeinflußt wird, zeigt die sogenannte UV5 Mutation des *lac*-Promotors, bei der die ursprüngliche *lac* "-10"- Region (TATGTT) zur kanonischen Sequenz hin mutiert ist und dadurch die Transkriptionseffizienz um den Faktor 2.5 höher liegt (Silverstone *et al.* 1970). Eine weitere Steigerung der Effizienz konnte durch Konstruktion hybrider Promotoren erreicht werden. So setzt sich der sogenannte *tac*-Promotor aus der "-35"-Region des *trp*-Promotors und der "-10"-Region des *lac*-Promotors zusammen (Amann *et al.* 1983; De Boer *et al.* 1983). Die Stärke dieses Promotors liegt wahrscheinlich sogar noch über der des ohnehin sehr starken λ P_L-Promotors. Man sollte aber nicht vergessen, daß z. B. im *lac*-Operon die Transkription auch durch DNA-bindende Proteine wie dem CAP-Protein reguliert wird (Zubay *et al.* 1970, Beckwith *et al.* 1972).

Expression in pUC8

Im Plasmid pUC8 befindet sich der Polylinkerbereich im *lacZ*-Gen, dessen Transkription durch den *lac*-Promotor reguliert wird. Kloniert man Fremd-DNA in diesen Polylinker, so wird auch diese zu RNA umgeschrieben. Da durch die Insertion die Synthese des α -Peptids verhindert wird, ist in mit inserthaltigem pUC8 transformierten Stämmen, die die *lacZ* M15 Mutation tragen, keine Komplementation zu funktionsfähiger β -Galactosidase mehr möglich. Daher ist im Gegensatz zu Kolonien mit nicht rekombinanten pUC-Vektoren keine Blaufärbung der gewachsenen Kolonien bei Zusatz des β -Galactosidase-Substrates X-Gal mehr zu beobachten. Der *lac*-Promotor wird durch den *lacI*-Repressor abgeschaltet. Jedoch kann durch Zugabe von IPTG diese Repression aufgehoben werden, so daß die Expression der einklonierten DNA auf einem Polyacrylamid-Gel als neu oder verstärkt auftretende Proteinbande nachzuweisen ist. Bei der Expression des in pUC8 klonierten und in induzierten JM83 Zellen transformierten 3d^{rif}-Gens würde man nur die Verstärkung einer Bande durch die Induktion mit IPTG erwarten, da einerseits das DNA-Fragment an sich schon einen Promotor trägt, der eine Transkription erlaubt (Heinrich 1987), andererseits in JM83 der *lac*-Promotor auf keinen Fall zu 100% reprimiert werden kann. Dies ist fast vollständig nur in Stämmen oder mit Vektoren, die das *lacI*^q-Allel tragen, möglich (Müller-Hill *et al.* 1968, Messing *et al.* 1981). Spur 1 in Fig. 28 zeigt den gesamten Proteinanteil von JM83 Bakterien ohne Vektor. In den Spuren 2 und 3 ist das in Lämmli-Puffer gekochte Bakterienpellet mit pUC8 aufgetragen, in Spur 2 ohne Induktion, in Spur 3 mit Induktion. Die Spuren 4 und 5 schließlich zeigen das Proteinmuster mit inserthaltigem Vektor einmal nicht induziert (Spur 4) und einmal induziert (Spur 5). Deutlich sichtbar ist in den Spuren 4 und 5 eine neu auftretende Bande mit dem relativen Molekulargewicht von etwa 42 K. Die Intensität dieser Bande ist in beiden Spuren entgegen der Erwartung allerdings identisch.

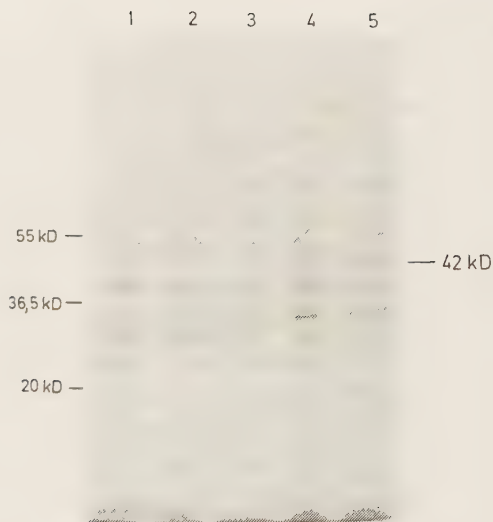


Fig. 28: Gelelektrophoretische Analyse von Expressionsversuchen in das Plasmid pUC8 klonierter Gene

1:100 verdünnte Übernachtskulturen der zu testenden Stämme wurden bei 37°C bis zu $OD_{500} = 0.6$ wachsen gelassen. Zu induzierende Kulturen wurden anschließend mit 1 mM IPTG weitere 4h bei 37°C inkubiert. Nach Abzentrifugation wurden 10 µl des in 200 µl 50 mM Tris pH 7.0 suspendierten Pellets mit 20 µl Lämmli-Puffer vermischt und 4 min auf 95°C erhitzt, bevor sie auf einem 15 %igem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt wurden.

Spur 1: JM83 Bakterien ohne Vektor

Spur 2: JM83 Bakterien transformiert mit pUC8; uninduziert

Spur 3: JM83 Bakterien transformiert mit pUC8; IPTG induziert

Spur 4: JM83 Bakterien transformiert mit pUC8-3d^{rif}; uninduziert

Spur 5: JM83 Bakterien transformiert mit pUC8-3d^{rif}; IPTG induziert

Am linken Rand sind als Molekulargewichtsmarker die Größen von Glutamatdehydrogenase (55 kD), Lactatdehydrogenase (36.5 kD) und Trypsininhibitor (20 kD) angegeben. Am rechten Rand ist mit 42 kD das vom 3d^{rif} Leserahmen IIb kodierte Protein hervorgehoben.

Die anderen Proteinbanden der entsprechenden Stämme belegen deutlich, daß in allen Fällen etwa die gleiche Proteinkonzentration aufgetragen wurde, die neu aufgetretene Bande also trotz IPTG-Stimulierung aus verschiedenen Gründen nicht induzierbar ist (siehe Diskussion). Das Expressionsprodukt von Leserahmen I ist bei dieser Elektro-phorese nicht identifizierbar, da es auf Grund seiner geringen Größe (etwa 11 kD) mit der Front laufen würde.

Expression in pKK223-3

Um die Induktion der Expression besser sichtbar zu machen, bietet sich die Verwendung von Vektoren mit stärkeren Promotoren an. Das Plasmid pKK223-3 (Fig. 29) besitzt den schon beschriebenen hybriden *tac*-Promotor (DeBoer *et al.* 1983), der aus der *trp* "-35"-Region und der *lacUV5* "-10"-Region zusammengesetzt ist (Fig. 30). Außerdem enthält der Vektor eine ribosomale Bindungsstelle (Fig. 30). Um "run off"-Transkripte von diesem sehr starken Promotor zu vermeiden, sind in Anschluß an den Polylinkerbereich, der demjenigen von pUC8 entspricht, die starken *rrnB* ribosomalen Terminatoren T_1 und T_2 (Brosius *et al.* 1981a; Brosius *et al.* 1981b) in den Vektor integriert. Diese Terminatoren dienen auch der Stabilisierung des Wirt-Plasmid-Systems. Der Rest des Vektors besteht aus pBR322 Anteilen (375-4245), er trägt also zur Selektion das Ap^r -Gen für β -Lactamase. Das Tetracyclinresistenz-Gen ist so mutiert, daß transformierte Stämme sensitiv für das Antibiotikum bleiben. Zur Abschaltung des starken Promotors ist ein hoher Überschuß an *lacI* Repressor nötig, so daß die Verwendung eines *lacI^q*-Stammes als Wirt geeignet erschien. Deshalb wurde der Stamm JM105 (Yanisch-Perron *et al.* 1985) gewählt. Er trägt auf dem F'Episom das *lacI^q* Allel, welches in einer Mutation des Promotors für das *lacI* Gen manifestiert ist.

Ein 100 μ l Aliquot des Transformationsansatzes wurde auf Agarplatten ausgestrichen, die sowohl Ampicillin- (50 μ g/ml) als auch Streptomycin (25 μ g/ml) enthielten und aus mit 1 μ g/ml Thiamin supplementiertem M9-Minimalmedium bereitet waren. Aus 10 der gewachsenen Klonen wurde das darin enthaltene Plasmid in Schnellaufschlüssen isoliert und zur Feststellung der korrekten Insertion mit *Hind*III hydrolysiert ähnlich wie für Insertionen in pUC8 auf Seite 65 beschrieben. 6 der getesteten Klone enthielten das 3d^{ref}-Gen in richtiger Orientierung, wie durch die bei der Hydrolyse entstandenen Fragmente mit 56 bp, 848 bp und 5826 bp gezeigt werden konnte (ohne Beleg). Zur Induktion wurden solche Klone bei einer optischen Dichte von 0.5 (bei 600 nm) für 4h mit 2 mM IPTG bei 37°C inkubiert. in der Kontrolle wurde genauso verfahren, jedoch ohne Zugabe des Induktors. Zur weiteren Kontrolle dienten Bakterien, deren Vektor pKK223-3 kein Insert enthielt. Auch sie wurden ebenso mit der entsprechenden Negativkontrolle einer Induktion unterworfen. Der auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel analysierte Proteinanteil zeigt wiederum keine nachweisbare Induktion von Proteinen mit IPTG (Fig. 31). Die Spuren 1 und 2 sind in ihrem Proteinmuster ebenso identisch wie die Spuren 3 und 4. Allerdings ist auch hier das Auftreten einer neuen Bande mit der relativen Molekularmasse von etwa 42 K zu erkennen. Da die hier zur Analyse der Proteine benutzte Methode der Coomassie-Färbung den gesamten während des Wachstums synthetisierten Proteinanteil sichtbar macht, wurde versucht, durch eine andere Methode spezifisch Proteine zu markieren. Hierzu sollte in einem zu dem obigen äquivalenten Ansatz nach der Induktion durch IPTG durch einen einstündigen Puls mit 130 μ Ci ³⁵S-Methionin erreicht werden, daß bevorzugt die dem vom *tac*-Promotor kontrollierten DNA-Bereiche entsprechenden Proteine radioaktiv markiert werden. Das Autoradiogramm des getrockneten Proteingels gleicht jedoch dem mit Coomassie gefärbten Gel (Fig. 32).

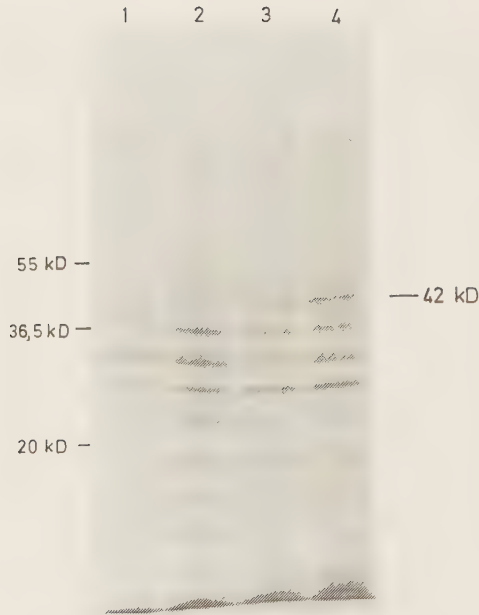


Fig. 31: Gelelektrophoretische Analyse von Expressionsversuchen mit dem Plasmid pKK223-3

Die Durchführung ist in der Legende zu Fig. 28 und im Methoden-
teil beschrieben. Lediglich die zur Induktion eingesetzte IPTG-
Konzentration wurde auf 2 mM erhöht.

Spur 1: JM105 Zellen, transformiert mit pKK223-3 ohne Insert

Spur 2: JM105 Zellen, transformiert mit pKK223-3 ohne Insert,
IPTG Induktion

Spur 3: JM105 Zellen, transformiert mit pKK223-3-3d^{rif}

Spur 4: JM105 Zellen, transformiert mit pKK223-3-3d^{rif},
IPTG Induktion

Am linken Rand sind als Molekulargewichtsmarker die Größen von
Glutamatdehydrogenase (55 kD), Lactatdehydrogenase (36.5 kD)
und Trypsininhibitor (20 kD) angegeben. Am rechten Rand ist mit
42 kD das vom 3d^{rif} Leserahmen IIB kodierte Protein hervor-
gehoben.

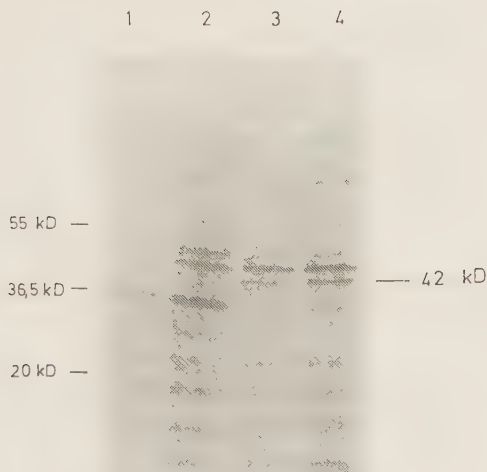


Fig. 32: Autoradiogramm von Expressionsversuchen mit pKK223-3

Die Durchführung entspricht dem in der Legende zu Fig. 31 geschilderten Verfahren. Nach der Induktion mit IPTG wurden in jeden Ansatz 130 μCi ^{35}S -Methionin gegeben und die Inkubationstemperatur für eine weitere Stunde aufrecht erhalten. Das getrocknete Gel wurde autoradiographiert.

Spur 1: JM105 Zellen, transformiert mit pKK223-3 ohne Insert
keine Induktion

Spur 2: JM105 Zellen, transformiert mit pKK223-3 ohne Insert,
IPTG Induktion

Spur 3: JM105 Zellen, transformiert mit pKK223-3-3d^{r1f}
keine Induktion

Spur 4: JM105 Zellen, transformiert mit pKK223-3-3d^{r1f},
IPTG Induktion

Am linken Rand sind als Molekulargewichtsmarker die Größen von Glutamatdehydrogenase (55 kD), Lactatdehydrogenase (36.5 kD) und Trypsininhibitor (20 kD) angegeben. Am rechten Rand ist mit 42 kD das vom 3d^{r1f} Leserahmen IIb kodierte Protein hervorgehoben.

Die Intensitätsunterschiede von in allen Spuren vorkommenden Banden sind auf variierende radioaktive Markierung der Proteine zurückzuführen.

Aus diesen Versuchen geht also eindeutig hervor, daß durch die Insertion des Rifampicinresistenz vermittelnden DNA-Fragmentes im Proteinmuster der transformierten Bakterien eine neue Bande mit etwa dem relativen Molekulargewicht auftritt, das dem Protein IIb entspricht. Die Synthese dieses Proteins ist aber unter den hier gewählten Bedingungen nicht induzierbar.

Expression in pJF118u

Um völlig sicher zu gehen, daß das Fehlen der Induktionsmöglichkeit unabhängig vom verwendeten Vektor ist, wurden analoge Experimente mit dem Expressionsvektor pJF118u (Fig. 33) versucht. Dieses Plasmid unterscheidet sich von pKK223-3 dadurch, daß ein 564 bp *Bam*HI-*Xma*III Fragment deletiert und statt dessen ein 1.26 kb Fragment mit dem *lacI*^q Gen in den Vektor integriert ist. Ansonsten sind beide Vektoren identisch, d.h. sie besitzen den gleichen *tac*-Promotor, Polylinker, Selektionsmarker etc.. Auch hier führten die Versuche mit 3d^{rif} als Insert in der *Bam*HI Stelle nicht zur gewünschten Induktion (ohne Beleg).

Einfluß des Wirtsstammes auf die Induktion

Für die Expression von Fremd-DNA in *E. coli* ist außer dem verwendeten Vektor auch der Wirtsstamm ausschlaggebend. Daher sollten verschiedene *E. coli*-Stämme auf ihr Expressions- oder Induktionsvermögen hin getestet werden. Kompetente Zellen der Stämme JM103, JM105, HB101 und MM294 wurden dazu mit dem Expressionsvektor pJF118u, in den das 3d^{rif}-Insert in die *Bam*HI Stelle einkloniert war, transformiert und deren Fähigkeit zur induzierbaren Proteinsynthese im üblichen Experiment getestet. Wie aus Tab.3 hervorgeht, unterscheiden sich die untersuchten Bakterienstämme in keiner Hinsicht.

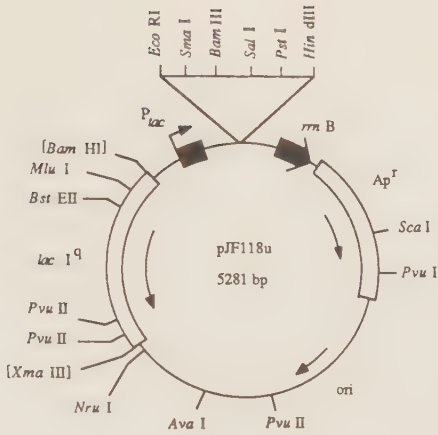


Fig. 33: Expressionsvektor pJF118u

Ap^r : Gen für β -Lactamase

P_{tac} : *tac*-Promotor

$lacI^q$: Promotor und Gen für den *lac* Repressor

rrnB : Terminatoren aus dem *rrnB* Operon

Die in eckigen Klammern angegebenen Restriktionsschnittstellen (resultierend aus der Vektorkonstruktion) sind deletiert.

Tab.3: Abhängigkeit der Expression vom verwendeten Wirtsstamm

Die Durchführung des Experimentes ist in der Legende zu Fig. 31 gegeben.

Die auf einem 15 %igem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennten Proteine zeigen bei Induktion mit 2 mM IPTG keinerlei Verstärkung der 42 K Bande.

	Synthese von Protein IIb	Induktion
JM103	+	-
JM105	+	-
HB101	+	-
MM294	+	-

RNA-Analyse

Die Tatsache, daß weder die Verwendung verschiedener Vektoren noch eine Auswahl an Wirtsstämmen zu einer induzierbaren Expression führt, läßt die Vermutung aufkommen, daß das von Heinrich 1987 postulierte rho-unabhängige Terminationssignal bei Position 53-76 bp tatsächlich in der Lage ist, die RNA-Synthese zu stoppen. Der nach Tinoco *et al.* (1973) berechnete δG -Wert von -78.6 kJ/mol deutet auf einen relativ starken Terminator hin. Sollte dieser wirklich funktionell sein, würde sich das Fehlen der Induktion der Proteinsynthese dadurch erklären lassen, daß die vom *tac*-Promotor ab transkribierte RNA sofort terminiert wird, eine Anreicherung des erst weit nach dem Terminator auf dem Template kodierenden Proteins IIb also gar nicht möglich wäre. Ist aber die RNA-Synthese induzierbar, so muß man davon ausgehen, daß irgendwo auf Translationsebene die Bildung des Proteins inhibiert wird. Welche der beiden Möglichkeiten nun die tatsächlich relevante ist, sollte durch die Hybridisierung radioaktiv markierter $3d^{rif}$ -DNA gegen die zellulären Ribonukleinsäuren ("Northern Blot") herausgefunden werden. Die *in vitro* Markierung des 2145 bp *Bam*HI Fragmentes mit ^{32}P wurde durch sog. Nick-Translation erreicht. Hierzu wurden durch Behandlung der DNA mit DNase, die vorher von jeglicher RNase-Verunreinigung befreit worden war (erhalten von und beschrieben bei Diersch 1986), Einzelstrangbrüche gesetzt, an denen die nach Inaktivierung der DNase durch Erhitzen DNA-Polymerase I aus *E. coli* (das sog. Kornberg-Enzym) angreifen konnte. Die $5' \rightarrow 3'$ Exonukleaseaktivität dieses Enzyms baut von den Strangbrüchen weg einen Strang der DNA ab, während derselbe Strang durch die $3' \rightarrow 5'$ Polymeraseaktivität in Gegenwart der vier dNTP's wieder synthetisiert wird. Durch Ersatz von dCTP durch $[\alpha\text{-}^{32}P]\text{dCTP}$ erzielt man so eine radioaktiv markierte, doppelsträngige DNA gleicher Sequenz. Die Auftrennung der gesamten Nukleinsäuren wurde durch Elektrophorese auf einem Agarose-Harnstoff-Gel erreicht, wobei die WirtsDNA auf der Auftragsstelle bleibt, die PlasmidDNA etwas in das Gel wandert während die RNA am besten aufgetrennt wird.

Durch Anfärben mit Ethidiumbromid konnte die RNA sichtbar gemacht werden (Fig. 34). Deutlich zu erkennen sind die der 23S- und 16S-rRNA entsprechenden Banden a und b ebenso wie die diffuse Verteilung der mRNA. Aufgetragen war in Spur 1 DNA/RNA aus JM105 Bakterien mit dem Plasmid pKK223-3 und dem 3d^rff-Insert, die keiner Induktion durch IPTG unterzogen waren, in Spur 2 derselbe Bakterienstamm mit Induktion und in Spur 3 als Kontrolle DNA/RNA aus JM105 Bakterien, deren Vektor pKK223-3 kein Insert besaß. Die in diesem Gel enthaltenen aufgetrennten Nukleinsäuren wurden durch Kapillardiffusion auf eine Hybond-Nylonmembran übertragen. Nach anschließender Hybridisierung der nick-translatierten Probe gegen die filtergebundene DNA/RNA wurde der Filter durch Waschen von nicht spezifisch gebundener ³²P-DNA befreit. Das resultierende Autoradiogramm wurde densitometrisch ausgewertet (Fig. 35). Die in den Spuren 1 und 2 stark markierte Bande a entspricht der inserthaltigen Plasmid-DNA, gegen die die Probe auf alle Fälle hybridisieren muß. Diese Bande fehlt natürlich in Spur 3, da hier das Plasmid kein Insert enthält. Des weiteren fällt in den Spuren 1 und 2 eine sehr schwache Bande b mit deutlich höherer Mobilität auf, deren Intensität allerdings etwa gleich ist. Diese Bande entspricht einer Hybridisierung gegen mRNA, die aber wegen der fehlenden Induktion nicht vom *tac*-Promotor weg synthetisiert worden sein kann. Da jedoch die einklonierte DNA im Bereich von 183-208 bp bzw. 275-301 bp zwei hypothetische Promotoren enthält, ist eine RNA-Polymerasereaktion von diesem weg denkbar. Diese Annahme wird sowohl durch die Abwesenheit der Bande b in Spur 3 als auch durch die einer mRNA von etwa 1900 Basen entsprechenden Größe von b in Spur 1 und 2 gestützt. Dies deutet auf einen Transkriptionsstart an dem von Heinrich (1987) postulierten Promotor P2 und eine Termination durch die *rrnB* Terminatoren hin. Die Hypothese einer Termination der vom *tac* Promotor regulierten Transkription an der Haarnadelstruktur im Bereich von 53-76 bp wird also durch dieses Experiment verfestigt.

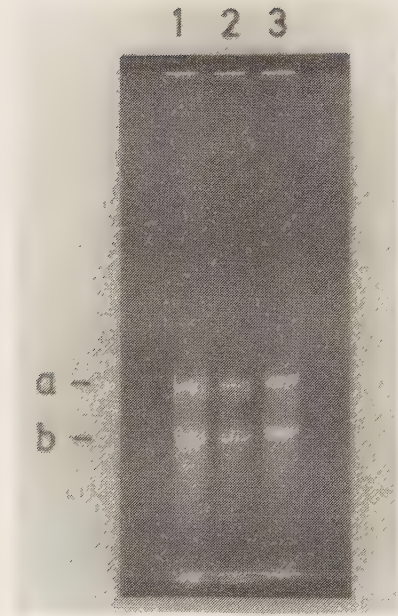


Fig. 34: Auftrennung von RNA aus JM105 Stämmen, die den Vektor pKK223-3 mit bzw. ohne dem klonierten 3d^{rif} Fragment enthalten

Die Isolierung der RNA und ihre Auftrennung auf einem Agarose-Harnstoff-Gel ist unter Methoden gut beschrieben.

RNA aus folgenden Stämmen wurde analysiert:

Spur 1: JM105, transformiert mit pKK223-3-3d^{rif} ohne Induktion

Spur 2: JM105, transformiert mit pKK223-3-3d^{rif} mit Induktion

Spur 3: JM105, transformiert mit pKK223-3 ohne Insert

Induziert wurde mit 2 mM IPTG.

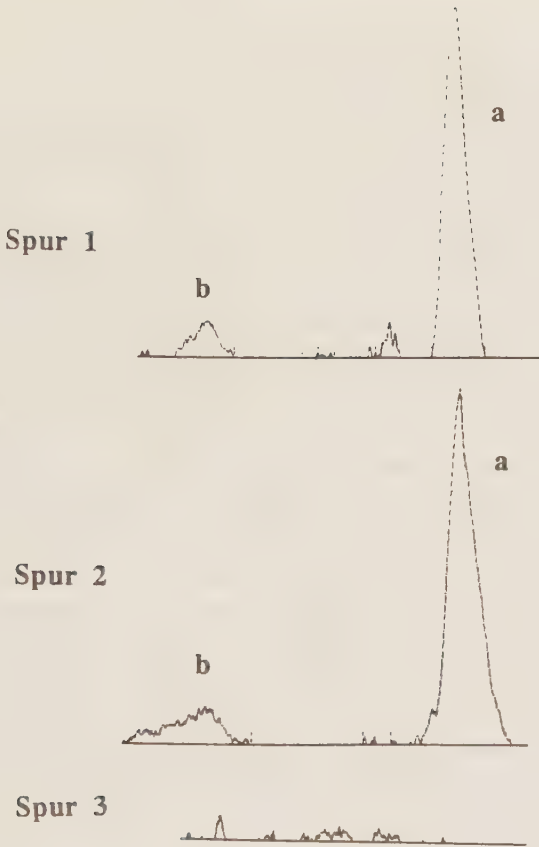


Fig. 35: Densitometrische Auswertung des Northern Blots mit den in Fig. 34 aufgetrennten Ribonukleinsäuren gegen das nick-translatierte 2145 bp *Bam*HI Fragment

Das in Fig. 34 gezeigte Gel wurde auf eine Hybond Nylon Membran übertragen und gegen eine durch Nick-Translation radioaktiv markierte DNA-Probe, wie im Methodenteil beschrieben, hybridisiert. Das resultierende Autoradiogramm wurde densitometrisch ausgewertet.

Spur 1: JM105, transformiert mit pKK223-3-3d^{rif} ohne Induktion

Spur 2: JM105, transformiert mit pKK223-3-3d^{rif} mit Induktion

Spur 3: JM105, transformiert mit pKK223-3 ohne Insert

Proteinanreicherung mit Ionenaustauschern

Die Löslichkeit von stark hydrophoben Proteinen ist abhängig vom verwendeten Detergens. So würde es nicht verwundern, wenn das hier untersuchte Protein bei den bisher angewandten Verfahren zur Zellwandlyse oder Gelelektrophorese in Lämmli-Puffer kaum oder nur unvollständig in Lösung ginge. Dies wäre eine Erklärung für die nicht besonders gute Nachweisbarkeit dieses Proteins (Kollenda 1985). Zur Bestimmung optimaler Solubilisierungsbedingungen sind zeitaufwendige Versuche mit unterschiedlichen Detergentien (auch in verschiedenen Kombinationen untereinander) nötig. Ein von Höß *et al.* (1988) entwickeltes Verfahren zur Gewinnung von Proteinen aus den nach der Bakterienlyse nicht löslichen Bestandteilen mit verschiedenen Ionenaustauschern schien hier geeignet zu sein, schnell zu einem befriedigenden Ergebnis zu gelangen. Hierbei wird die Lysis der Bakterienmembran sowohl durch Lysozym als auch durch Ultraschallbehandlung in Gegenwart des Detergens' Nonidet P-40 (NP-40) und 10% Glycerin erreicht. Etwaige Proteaseaktivitäten werden durch die Hemmstoffe Aminoacetonitrilhemisulfat und Phenylmethylsulfonylfluorid unterbunden. Die Grundidee dieses neuen Verfahrens basiert auf der Zugabe von Ionenaustauschern wie Q-Sepharose FF und S-Sepharose FF oder von Phenylsepharose direkt zu der durch Ultraschall aufgeschlossenen Bakteriensuspension. Durch diese Maßnahme werden auch Proteine, die sich nicht so ohne weiteres lösen, aus dem Pellet an den Ionenaustauscher adsorbiert und können nach dem Waschen des Materials mit einem Hochsalzpuffer wieder eluiert werden. So in Lösung gebracht stehen die angereicherten Proteine für die SDS-Gelelektrophorese zur Verfügung.

Bakterien, die mit dem das *Bam*HI Fragment beinhaltenden Vektor pUC8 transformiert waren, wurden durch Lysozym- und Ultraschallbehandlung aufgeschlossen und die lysierte Lösung aliquotiert.

Um die Löslichkeit des Proteins IIB ohne Austauscher zu untersuchen, wurde durch Zentrifugation eines Aliquots eine Trennung in Pellet und Überstand vollzogen, die dann auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel analysiert wurden. Da die Affinität zu Ionenaustauschern von Protein zu Protein differiert, mußte für das Protein IIB zuerst das am besten geeignete Adsorptionsmaterial gefunden werden. Dazu wurden zu Aliquots des Ultraschallaufschlusses die Materialien S-Sepharose FF, Q-Sepharose FF und Phenylsepharose gegeben. Nachdem durch Waschen dieser Materialien der nicht gebundene Proteinanteil entfernt war, konnte mit 0.5 M NaCl das adsorbierte Protein freigesetzt werden. Sowohl die Waschlösungen als auch die Eluate wurden auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Die im Gel enthaltenen Proteine wurden durch einen halb-trockenen Elektrobplot (nach Herstellerangaben der Firma Biometra) auf eine Nitrocellulosemembran (BA 85, Schleicher und Schüll) übertragen und auf ihre Fähigkeit, Protein IIB-spezifische Antikörper in einem "Western-Blot" zu binden, untersucht. Die gebundenen Antikörper konnten durch Inkubation mit ^{125}J -Protein A und anschließender Autoradiographie sichtbar gemacht werden (Fig. 36). In den Spuren 1 und 11 ist als Kontrolle ein Aliquot des Ultraschallaufschlusses von Bakterien, deren Plasmid kein Insert besitzt, aufgetragen. Wie zu erwarten, erscheint keine Bande im Gegensatz zu Spur 2, in der das Lysat von Bakterien mit rekombinantem Vektor aufgetrennt worden ist. Die Spuren 3 und 4 zeigen den Überstand bzw. das Pellet des Lysats von Spur 2. Deutlich sichtbar sind aus dem bei der Zentrifugation erhaltenen Niederschlag durch das Kochen in Lämmli-Puffer noch ungelöste Proteinanteile zum Teil in Lösung gegangen. Allerdings verschwand der Niederschlag durch das Erhitzen nur zu einem geringen Teil, so daß von immer noch großen nicht gelösten Bestandteilen ausgegangen werden muß. Die Solubilisierung dieser Proteinanteile sollte durch Ionenaustauscher ermöglicht werden.

Der Austauscher S-Sepharose FF ist anscheinend nur schlecht in der Lage, das gewünschte Protein aus dem Pellet freizusetzen und zu binden, da weder im Waschpuffer noch im Eluat irgend eine Spur davon nachzuweisen ist (Spur 5: Waschpuffer; Spur 8: Eluat). Die Spuren 6 und 9 zeigen die Versuche mit Phenylsepharose. Ein geringer Proteinanteil im Waschpuffer (Spur 6) steht hier praktisch keinem Eluat (Spur 9) gegenüber. In Spur 7 ist der Waschpuffer aus dem Experiment mit Q-Sepharose FF aufgetragen. Hier erkennt man einen markanten Unterschied zu den anderen Materialien, da deutlich eine Bande zu erkennen ist. Noch auffälliger ist die Differenz von Spur 10 zu den Spuren 8 und 9. Hier ist eindeutig gebundenes Protein eluiert worden. Der Austauscher Q-Sepharose FF ist also unter den getesteten der am besten geeignete für die Freisetzung unlöslichen Proteins IIb aus dem Niederschlag und sollte die Möglichkeit eröffnen, dieses Protein in Verbindung mit dem Antiserum leichter nachweisen zu können.

Um die Eignung von Q-Sepharose FF zur Anreicherung von Protein IIb noch zu unterstreichen, wurde dasselbe Experiment in größerem Maßstab und mit anderer Kontrolle wiederholt. Diesmal wurden als Kontrolle Wildtyp-Bakterien identisch behandelt. Das densitometrisch ausgewertete Autoradiogramm des auf Nitrocellulosefilter übertragenen Gels (Fig. 37) zeigt in Spur 1 eine stark radioaktiv markierte Bande mit einem relativen Molekulargewicht von 42 K. Dies entspricht genau der früher nachgewiesenen Mobilität von Protein IIb. Die zur Kontrolle gleich behandelten Wildtyp-Bakterien zeigen in Spur 2 keinerlei ^{125}J -Markierung. Ruft man sich noch einmal das Resistenzverhalten der untersuchten Bakterien in Erinnerung, wonach diejenigen, die mit dem rekombinanten Vektor transformiert waren, bis zu 90 $\mu\text{g/ml}$ Rifampicin tolerierten, der Wildtyp-Stamm dagegen schon bei 5 $\mu\text{g/ml}$ im Wachstum inhibiert war, so folgt daraus ganz klar, daß das klonierte *Bam*HI Fragment tatsächlich einen *in vivo* exprimierbaren Leserahmen enthält, dessen Proteinprodukt direkt in die Rifampicinresistenz involviert ist.

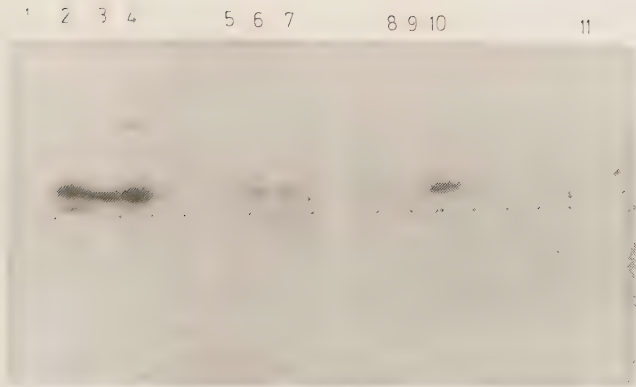


Fig. 36: Western Blot von Proteinfractionen vor und nach Behandlung mit verschiedenen Ionenaustauschern

JM83 Bakterien aus einer 300 ml Kultur, die mit dem Vektor pUC8-3d^{rif} transformiert waren, wurden nach Abzentrifugation zur Lysis in 25 ml Lysozym-haltigem Puffer (50 mM Tris pH 8.0, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM DTT, 1 mM AANS, 10% Glycerin, 0.5% NP-40) suspendiert und in 2.5 ml Aliquots geteilt. Der Aufschluß erfolgte mit Ultraschall. Für die Versuche mit Austauschern wurden die nach Zentrifugation der Aliquots erhaltenen Niederschläge jeweils mit 2.5 ml des suspendierten Ionenaustauschers behandelt wie in Methoden S. 57 beschrieben.

- Spur 1: Kontrolle mit pUC8 ohne Insert (wie Fig. 28 Spur 2)
- Spur 2: Lysat von JM83 pUC8-3d^{rif} (40 µl eines mit Ultraschall behandelten 2.5 ml Aliquots)
- Spur 3: 20 µl aus dem Überstand eines zentrifugierten Aufschlusses eines 2.5 ml Aliquots von JM83 pUC8-3d^{rif}
- Spur 4: Das bei der Zentrifugation des Aliquots aus Spur 3 erhaltene Pellet wurde in 200 µl Lämmli-Puffer 5 min bei 95°C gekocht. 40 µl davon wurden aufgetragen.
- Spur 5: Waschpuffer von S-Sepharose FF (20 µl)
- Spur 6: Waschpuffer von Phenylsepharose FF (20 µl)
- Spur 7: Waschpuffer von Q-Sepharose FF (20 µl)
- Spur 8: Eluat von S-Sepharose FF (20 µl)
- Spur 9: Eluat von Phenylsepharose FF (20 µl)
- Spur 10: Eluat von Q-Sepharose FF (20 µl)
- Spur 11: Kontrolle mit pUC8 ohne Insert (identisch mit Spur 1)

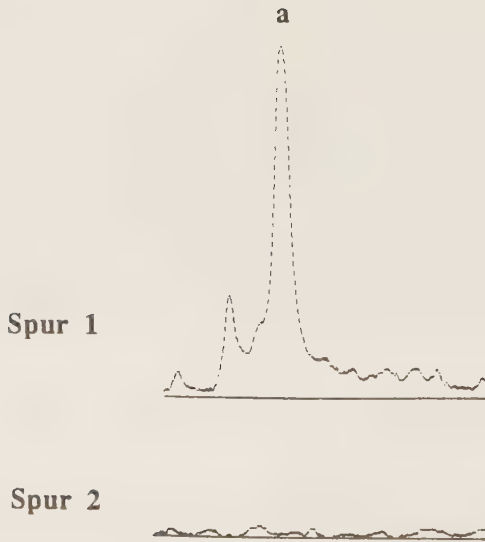


Fig. 37: Desitometrisch ausgewerteter Western Blot einer über Q-Sepharose FF gereinigter Proteinfraktion aus JM83 pUC8-3d^{rif}

Auf ein 15 %iges SDS-Polyacrylamid-Gel wurden Proteine aufgetragen, die bei Behandlung der abzentrifugierten Bakterien wie in Methoden beschrieben über Adsorption an Q-Sepharose FF angereichert worden waren. Die Proteinkonzentration der je 20 µl Auftragsvolumen wurde mit 1 mM EDTA auf gleiche OD₂₈₀ eingestellt.

Spur 1: JM83 pUC8-3d^{rif}

Spur 2: JM83

a: 42 K Protein IIb

Lokalisation des Genproduktes

Die Tatsache, daß das Protein IIb einen Anteil an hydrophoben Aminosäuren von 33.4% besitzt, führt zu der Vermutung, es sei Bestandteil zellulärer Membranen. Nur dort kann es auf Grund seiner Hydrophobie gelöst vorliegen. Auch die Computerberechnete Sekundärstruktur stützt diese Hypothese, da das Protein eine längere α -Helix aus hydrophoben Aminosäuren besitzt. Auszuschließen ist dagegen Polytopie (Heinrich 1987). Sehr häufig existiert bei Membranproteinen ein Signalpeptid für die Integration in oder die Translokation des Polypeptides durch die Membranen, welches in einem späteren Prozessierungsschritt abgespalten wird. Solch eine Sequenz ist bei Protein IIb ebenso nicht vorhanden. Das läßt den Schluß zu, dieses Protein ist mit hoher Wahrscheinlichkeit in die innere Zellmembran von *E. coli* integriert, da dort Membranproteine bekannt sind, die kein Signalpeptid besitzen (Fowler *et al.* 1981, Voordouw und Brenner 1985). Auch die Codonauswahl deutet eher auf eine Lokalisation in der inneren Membran hin, da die verwendeten Codons denjenigen von schwach exprimierten Proteinen entsprechen, die meisten Proteine der äußeren Membran allerdings eine gute Syntheserate besitzen (Voordouw und Brenner 1985).

Da mit der Anreicherung über Q-Sepharose FF eine effiziente Methode zum Nachweis des Proteins IIb zur Verfügung steht, sollten *E. coli* Membranen sowohl von Rifampicin-resistenten als auch von sensitiven Bakterien in innere und äußere getrennt und auf ihren Gehalt an diesem Protein untersucht werden. Die Trennung der Membranen wurde durchgeführt wie bei Kollenda (1985) beschrieben. Die im zur Trennung benutzten Sucrose-Gradienten sichtbaren drei Banden enthalten in der oberen Proteine der inneren Membran und in der unteren Proteine der äußeren Membran. Die in der Mitte sichtbare Bande setzt sich aus noch nicht aufgetrenntem Material zusammen. Die durch Austropfen des Gradienten gewonnenen Membranfraktionen wurden mit Q-Sepharose FF so behandelt wie im Methodenteil beschrieben.

Die auf einem Gel aufgetrennten durch Adsorption an Q-Sepharose FF und Elution erhaltenen Membranbestandteile wurden durch ElektrobloTTing auf ein Nitrocellulose-Filter übertragen, womit dann ein "Western-Blot" durchgeführt werden konnte. Das durch Inkubation mit ^{125}J -Protein A und Filmexposition gewonnene Autoradiogramm wurde densitometrisch ausgewertet (Fig. 38). Es zeigt in den Spuren 1, 2 und 3 den Membranproteinanteil von Bakterien, die durch Transformation mit pUC8-3d Rifampicin-resistent geworden sind. Spur 1 entspricht der inneren Membran, Spur 3 der äußeren und Spur 2 enthält ungetrenntes Membranmaterial. Auffällig ist der Intensitätsunterschied der sichtbaren Bande zwischen Spur 1 und den Spuren 2 und 3. Die innere Membran enthält also um ein Vielfaches mehr Protein IIb als die äußere, wenn man voraussetzt, daß die schwach zu erkennenden Banden nicht Verunreinigungen der Membranfraktionen sind. Die in Spur 4 aufgetragenen Gesamtmembranproteine von Wildtyp-Bakterien führen zu keinerlei sichtbaren Banden, was nochmals die Spezifität des verwendeten Antiserums unterstreicht. Als weitere Kontrolle ist in Spur 5 eine Gesamtproteinpräparation aus resistenten Bakterien aufgetragen, aus der das Protein IIb auch über Q-Sepharose FF angereichert wurde. Hier ist, wie zu erwarten, eine Bande mit identischer Mobilität zu sehen. Da vor der Gelelektrophorese der Proteingehalt der aufzutragenden Proben (etwa 30 μg pro Slot) durch Einstellen auf gleiche OD₂₈₀ mit 1 mM EDTA in Übereinstimmung gebracht wurde, belegen die hier dargestellten Experimente eindeutig die ausschließliche Existenz des Rifampicinresistenz vermittelnden Proteins in der inneren, cytoplasmatischen Bakterienmembran. Diese Erkenntnis stimmt gut mit den oben formulierten Hypothesen überein.

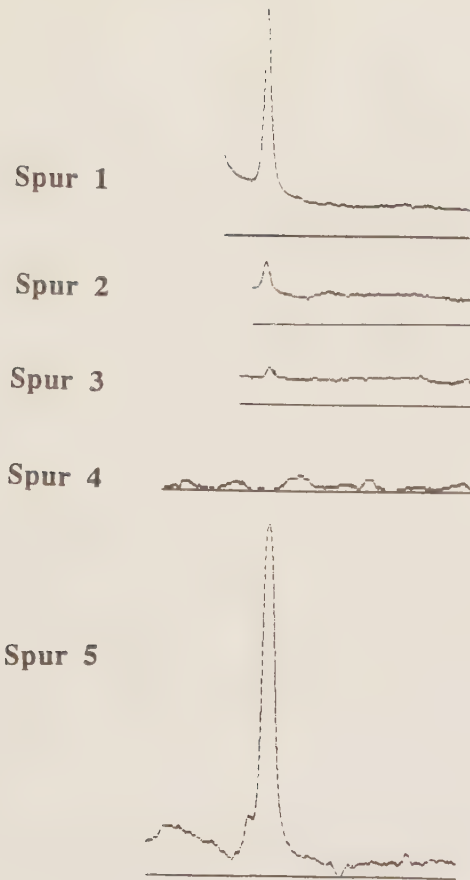


Fig. 38: Densitometrisch ausgewertete Membrananalyse
Rifampicin-resistenter und sensibler Bakterienstämme

Die über ein 15 %iges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennten Membranproteine wurden einem Western Blot mit dem Kaninchen-serum unterzogen. Die Konzentration der pro Spur aufgetragenen 20 μ l Proteinlösung wurde durch Verdünnung mit 1 mM EDTA auf gleiche OD₂₈₀ (entspricht etwa 30 μ g/Slot) eingestellt.

Spur 1: innere Membran von JM83 pUC8-3d^{rif}

Spur 2: ungetrennter Membrananteil von JM83 pUC8-3d^{rif}

Spur 3: äußere Membran von JM83 pUC8-3d^{rif}

Spur 4: Gesamtmembranproteine von JM83

Spur 5: Gesamtproteingehalt von JM83 pUC8-3d^{rif} wie in Fig. 37
Spur 1

Funktion des Genproduktes

Prinzipiell stehen zur Vermittlung von Rifampicinresistenz mehrere Möglichkeiten zur Auswahl. So kann das dafür verantwortliche Protein diesen Effekt durch Abbau des Antibiotikums in der Zielzelle induzieren. In die Bakterien eindringender Hemmstoff würde demnach sofort so verändert, daß er keine antibiotische Wirkung mehr ausüben kann.

Zur Feststellung solcher Abbauprodukte von Rifampicin in resistenten Zellen wurden Übernachtskulturen sowohl von *E. coli* Wildtypstämmen (hier JM83) als auch von mit pKK223-3-3d transformierten JM105 Bakterien abzentrifugiert und nach Aufnahme in LB-Medium direkt mit 200 µg/ml Rifampicin 1 h inkubiert. Zur Kontrolle wurden gleich behandelte Zellen vor der Rifampicinzugabe mit 0.02% NaN₃ versetzt, um die bakterielle Atmung zu unterbinden. Extrakte so behandelter Zellen wurden zur Anreicherung von Rifampicin und der Abbauprodukte mit Chloroform ausgeschüttelt.

Eine dünnschichtchromatographische Analyse der Rifampicinumwandlungsprodukte auf Silica Gel 60F Platten (Merck) bei Verwendung von CHCl₃/Methanol : 80/20 als Laufmittel ergab nach Analyse unter kurzwelligem UV-Licht nur zwei sichtbare dunkle Flecken auf grünem Hintergrund, deren Wanderungsgeschwindigkeit der Chinon- und Hydrochinonform des Rifampicin entsprechen (Fig. 39A).

Zur Untersuchung der Frage, ob bakterielle Zellextrakte Rifampicin verändern können, wurden Extrakte derselben Stämme wie in Fig. 39A durch Aufschluß mit Ultraschall gewonnen, die unterschiedliche Zeiten (5, 10, 30 und 60 min) mit je 200 µg/ml Rifampicin bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Durch Chloroform-Extraktion konnten das enthaltene Antibiotikum und auch dessen mögliche Abbauprodukte aus den Inkubationsmischungen angereichert werden. Die so isolierten Substanzen wurden ebenso über Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Auch hier sind keine Verbindungen bei der Analyse unter UV-Licht erkennbar, die ein anderes Laufverhalten zeigen als Rifampicin (Chinon- bzw. Hydrochinonform) (Fig. 39B).

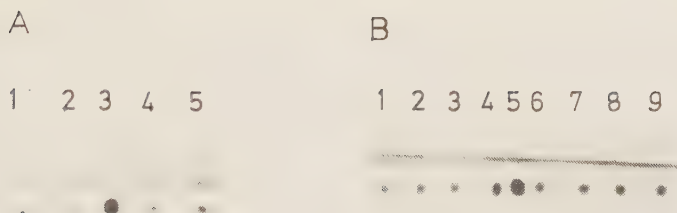


Fig. 39: Analyse des Rifampicin- bzw. Rifampicinderivatgehaltes in Zellextrakten resistenter und sensibler Bakterienstämme

A JM83 und JM105 pKK223-3-3d^{rif} Zellen wurden 1h mit 200 µg/ml Rifampicin inkubiert und je 10 µl von Extrakten dieser Stämme dünnenschichtchromatographisch aufgetrennt:

Spur 1: JM83

Spur 2: JM105 pKK223-3-3d^{rif}

Spur 3: 10 µl einer 150 µg/ml Rifampicin-Lösung

Spur 4: JM83 in Gegenwart von 0.02 % NaNa₃

Spur 5: JM105 pKK223-3-3d^{rif} in Gegenwart von 0.02 % NaNa₃

B Extrakte von JM83 und JM105 pKK223-3-3d^{rif} wurden unterschiedliche Zeiten mit je 200 µg/ml Rifampicin inkubiert.

Spur 1: JM83 5 min Spur 6: JM105 pKK223-3-3d^{rif} 5 min

Spur 2: JM83 10 min Spur 7: JM105 pKK223-3-3d^{rif} 10 min

Spur 3: JM83 30 min Spur 8: JM105 pKK223-3-3d^{rif} 30 min

Spur 4: JM83 60 min Spur 9: JM105 pKK223-3-3d^{rif} 60 min

Spur 5 zeigt zum Vergleich 10 µl einer 150 µg/ml Rifampicin-Lösung.

Die kreisförmigen Flecken entsprechen der Hydrochinon-Form von Rifampicin, die länglichen der Chinon-Form.

Beide Experimente sprechen dafür, daß weder intakte (atmende bzw. nicht atmende) Bakterien noch deren Zellextrakte (selbst, in Gegenwart der Resistenz-hervorrufenden Plasmide) in der Lage sind, zugesetztes Rifampicin zu verändern. Ob allerdings durch die Transformation von *E. coli* mit 3d^{rif} tragenden Plasmiden das Verhältnis der Chinon- und Hydrochinonform des Rifampicins zueinander beeinflußt wird, wie es hier den Anschein hat (Fig. 39A Spuren 1 und 4 verglichen mit den Spuren 2 und 5), bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

Untersuchungen zur Dominanz der Mutation

Heinrich postulierte 1987 eine Dominanz des mutierten, Rifampicinresistenz vermittelnden Genfragmentes über das chromosomale Wildtyp-Gen. Diese sei darin begründet, daß Zellen, die mit einem das *Bam*HI-Fragment enthaltenden Vektor transformiert waren, nach einer kurzen Adaptionsphase immer die Sensitivität gegenüber dem Antibiotikum verloren. Es hat also den Anschein, als würden im Überschuß synthetisierte plasmidkodierte Genprodukte die chromosomal kodierten, die sehr wahrscheinlich in sehr viel weniger Kopien vorliegen, verdrängen. Gibt es wirklich einen solchen Gen-Dosis-Effekt, so sollte der ursprünglich durch Pl Transduktion gewonnene Rifampicin resistente Stamm 10/lt, der also neben dem Wildtyp-Gen ebenso das mutierte Gen auf dem Chromosom in einer Kopie (sofern nicht Rekombination stattgefunden hat) enthält, nach einer Transformation mit dem klonierten WT- α Fragment wieder Sensitivität gegenüber dem Inhibitor zeigen. Dazu wurden das 2149 bp Wt- α Fragment, welches keine Resistenz induzieren kann, in die *Bam*HI Stelle von pUC12 kloniert und in kompetente 10/lt Zellen transformiert. Nach Selektion auf Ampicillinresistenz und Verlust der β -Galactosidase-Aktivität wurden weiße Klone aufgeschlossen, der rekombinante Vektor isoliert und mit *Bam*HI hydrolysiert.

Durch Agarose-Gelelektrophorese der Restriktions-produkte konnte die Insertion bestätigt werden (ohne Beleg). Positive Klone wurden auf Rifampicinresistenz getestet und zeigten überraschenderweise keine Veränderung der ursprünglichen minimalen Hemmstoffkonzentration von 100 µg/ml. Durch eine Überexpression des nun plasmidkodierten WT- α Gens kann also nicht der gegenteilige Effekt mit einer Kompensation der Rifampicinresistenz hervorgerufen werden. Dadurch wird die Hypothese eines Gen-Dosis-Effektes sehr unwahrscheinlich.

DISKUSSION

Die Fähigkeit von Antibiotika als sehr stark hydrophoben Substanzen die Membranen von Bakterien permeieren zu können, regte schon seit langem vielerlei Untersuchungen an. Bedenkt man, daß selbst gram-negative Bakterien wie *E. coli* mit ihrem komplizierten Zellhüllenaufbau für die meisten Antibiotika sensitiv sind - wenn auch deutlich reduziert im Vergleich zu gram-positiven oder Mycobakterien (Nikaido 1979) - so stellt sich schnell die Frage nach den Transportmechanismen für hydrophobe Verbindungen durch die Membran.

In dieser Arbeit galt das besondere Interesse der Resistenz von *E. coli* Zellen gegen Rifampicin. Dieses Antibiotikum inhibiert durch Bindung an die β -Untereinheit (im Polypeptidkomplex) der *E. coli* RNA-Polymerase die Elongation der nascierenden RNA-Kette (Hartmann *et al.* 1967, 1985, Wehrli 1983). Daher ist es nur natürlich, daß Rifampicin-resistente Stämme Mutationen im Gen für die β -Untereinheit der RNA-Polymerase, dem *rpoB* Gen, aufweisen (Ovchinnikov *et al.* 1981, Lisitsyn *et al.* 1984). Rifampicin-resistente Mutanten, deren RNA-Polymerase weiterhin sensitiv ist, konnte Tropschug (1981) erstmals isolieren. Unabhängig davon erzeugte Kollenda (1981, 1985) durch Insertion des Bakteriophagen Mu Resistenz, die ebenfalls nicht an das *rpoB* Gen gekoppelt war. Heinrich (1987) klonierte und sequenzierte den für Rifampicinresistenz verantwortlichen DNA-Abschnitt aus von Tropschug isolierten Mutanten (10/1t und 5/3), der in der vorliegenden Arbeit näher untersucht und *in vivo* exprimiert werden sollte.

Von den auf diesem Abschnitt liegenden zwei offenen Leserahmen konnte Heinrich (1987) mit einer Deletion von vier Guaninresten im größeren (IIb) im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp DNA-Abschnitt die eventuell für den Phänotyp der Rifampicin-resistenz verantwortliche Mutation lokalisieren. Die nicht ganz gesicherte Austauschmutation G→A auf der 5'Seite des kleinen Leserahmens I konnte in dieser Arbeit durch Rekombination von Wildtyp- und Mutantensequenzen als nicht ausschlaggebend für den Verlust der Antibiotikasensitivität charakterisiert werden. Diesen Befund stützt auch die Tatsache, daß allein der klonierte Leserahmen IIb nach Transformation des entsprechenden Plasmides in *E. coli* auch zur Entwicklung von Resistenz führt. Diese ist allerdings deutlich geringer als diejenige der Ursprungsmutanten. Als Erklärung hierfür kann man ein in Resistenzverstärkung sichtbares Zusammenwirken der Produkte I und IIb postulieren. Weitere Hinweise für ein mögliches Coagieren der beiden Proteine werden später diskutiert.

Der Abfall der Rifampicinresistenz bei Expression des Leserahmens IIb alleine könnte allerdings auch noch auf ganz andere Weise begründet werden:

Die zur Expression des Leserahmens IIb benötigte ribosomale Bindungsstelle bei Position 712 bis 715 sollte für effektive Bindung des Ribosoms an die RNA nicht basengepaart vorliegen (Shine und Dalgarno 1975, Gold *et al.* 1981, McLaughlin *et al.* 1981), da ihre Komplementarität zum 3'Ende der 16S rRNA die Bindung an das Ribosom bewirken soll. Bei der in dieser Arbeit beschriebenen Klonierungsstrategie einer Insertion des 1450 bp *DraI/BamHI* Fragmentes in den mit *SmaI/BamHI* linearisierten Vektor, die auf Grund der geringen Anzahl brauchbarer Schnittstellen im 3d^{ref} Fragment nicht anders anzulegen war, besteht die Möglichkeit einer basengepaarten Sekundärstruktur des Transkriptionsproduktes im Bereich der Shine-Dalgarno Sequenz. Diese ist in der Lage, mit der Klonierungsstelle *DraI/SmaI* eine Haarnadelstruktur auszubilden (Fig. 40).

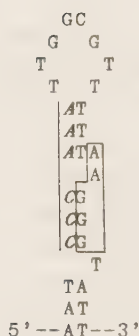


Fig. 40: RNA-Sekundärstruktur im Bereich der S.D.-Sequenz

Die umrandete Sequenz entspricht der Shine-Dalgarno-Sequenz. Der durch eine Linie gekennzeichnete Sequenzbereich stellt die Klonierungsstelle dar, wobei AAA aus der *DraI*-Schnittstelle des Fragmentes und CCC aus der *SmaI* Schnittstelle des Vektors stammen.

Die hier vorgeschlagene Haarnadelstruktur ist aber bei einem nach Tinoco *et al.* (1973) berechneten δG -Wert von -4.6 kJ/mol nicht von besonders hoher Stabilität, so daß sicher ein kleiner Anteil der RNA translatiert werden kann. Die Folge davon wäre allerdings eine im Vergleich zum ursprünglich kloniertem 3drif Fragment deutliche Herabsetzung der Konzentration an Protein IIb, die man mit der vorher gezeigten drastischen Reduktion der Rifampicinresistenz auf eine minimale Hemmstoffkonzentration von etwa $15-20$ $\mu\text{g/ml}$ in Verbindung bringen kann. Die Abhängigkeit einer Antibiotikumresistenz von der Konzentration des dafür verantwortlichen Proteins ist z.B. für den Fall der Tetracyclinresistenz und des tet-Proteins beschrieben (West und Rodriguez 1982, Rauschel 1985). Die durch das 1783 bp Fragment vermittelte Rifampicinresistenz bis 20 $\mu\text{g/ml}$ Antibiotikum läßt sich allerdings mit dieser Hypothese nicht in Einklang bringen, da hier keine Hinweise auf eine basengepaarte Shine-Dalgarno Sequenz existieren.

Durch Genexpression *in vivo* im Minizellsystem und *in vitro* im Zubay-System des Rifampicinresistenz vermittelnden DNA-Fragmentes bestimmte Kollenda 1985 die relative Molmasse des darauf kodierten Proteines zu 58 ± 5 K.

Die durch Analyse der DNA-Sequenz bestimmten zwei darauf befindlichen offenen Leserahmen I und IIb (Fig. 9) lassen allerdings bei korrekter Umsetzung in Polypeptide nur zwei potentielle Proteine mit den absoluten Molekulargewichten von 11424 D für Protein I und 48486 D für Protein IIb zu. Dies steht in klarem Widerspruch zu den von Kollenda bestimmten relativen Molmassen, da es keine Hinweise auf eine strukturell bedingte Verringerung der Mobilität von Proteinbanden in SDS-Polyacrylamid-Gelen gibt, die zu einem "falschen" Molekulargewicht führen könnten. Der gegenteilige Effekt einer erhöhten Mobilität, die zu geringeren relativen Molmassen führt, ist allerdings sehr gut bekannt. So verhält sich das *lacY* Genprodukt, die Lactose Permease als hydrophobes integrales Membranprotein des absoluten Molekulargewichtes von 46500 D im SDS-Gel wie ein Protein der Masse 33 kD (Cronan *et al.* 1987). Auch das tet-Protein zeigt einen solchen Effekt (Backman und Boyer 1983, Tait und Boyer 1978). Unter diesen Aspekten erscheint die in der vorliegenden Arbeit reproduzierbar gefundene relative Molmasse von Protein IIb mit 42 K sehr plausibel, zumal auch dieses Protein einen hohen Anteil hydrophober Aminosäuren besitzt. Die erhöhte Mobilität wird durch eine Überschubbindung von SDS an die hydrophoben Bereiche erklärt, was dann auf Grund der höheren negativen Ladung den beschriebenen Effekt zur Folge hat (Cronan *et al.* 1987).

Zur genauen Untersuchung des Resistenzmechanismus' scheint eine Anreicherung des dafür verantwortlichen Proteins in der Zukunft unumgänglich. Die Voraussetzung dafür ist eine *in vivo* Überexpression des entsprechenden Genes in besonderen Expressionsvektoren. Das in dieser Arbeit unter anderem gewählte Expressionssystem nach Tabor und Richardson (1985) ist in der Lage, spezifisch beide Leserahmen zu exprimieren.

Die in den Spuren 1 und 4 (Fig. 21) gezeigten Kontrollen, bei denen der Puls mit ^{35}S -Methionin bereits vor der Induktion durch Temperaturerhöhung stattfand, zeigen eine radioaktive Markierung aller exprimierten Proteine. Die Expression des 42 K Proteins ist hier wie auch in den Kontrollen der Spuren 2 und 5 nicht nur durch Translation der von T7 RNA Polymerase, sondern zusätzlich auch auf Grund des auf dem Fragment befindlichen internen Promotors (Heinrich 1987) der von *E. coli* RNA Polymerase synthetisierten mRNA denkbar. Allerdings scheint auch in Zellen, die mit nicht rekombinantem pT7-4 transformiert waren, ein Protein ähnlicher relativer Molmasse exprimiert zu werden (Fig. 21A, Spur 1); nur durch Inhibierung der *E. coli* RNA Polymerase mit Rifampicin ist es möglich, das exprimierte plasmidkodierte 42 K Protein sichtbar zu machen.

Bemerkenswert ist die Tatsache, daß das 1783 bp *AccI/BamHI* Fragment nur in geringerem Maße (Fig. 26) und die durch *DraI* Hydrolyse voneinander getrennten Leserahmen jeder für sich überhaupt nicht (Fig. 27) im Tabor-T7-System exprimiert werden können. Allerdings wurden auch für die Expression von tet-Protein und Chloramphenicolacetyltransferase deutlich unterschiedliche Syntheserausbeuten bei Verwendung dieses Systems gefunden, die entsprechenden mRNA-Syntheseraten waren aber vergleichbar (Weiß 1988). Daraus ist klar die Möglichkeit einer posttranskriptionalen Kontrolle der Expression zu fordern. Auch später diskutierte Gründe sprechen für diese Hypothese.

Betrachtet man sich die Versuche zur Induktion der Proteinbiosynthese, so fällt auf, daß mit keinem der verwendeten Plasmide oder Wirtsstämme eine deutliche Induktion der Expression zu erzielen ist, die Expression selbst aber in allen Vektoren gut möglich ist. Der Grund dafür sollte eigentlich das klonierte 3d^{rif} Fragment sein.

Auf diesem fand Heinrich (1987) zwei rho-unabhängige Terminatoren (Brendel und Trifonov 1984), den ersten mit -78.6 kJ/mol im nicht-translatierten Bereich, beginnend bei Position 53, den zweiten, mit -71 kJ/mol etwas instabileren, beginnend bei Position 686. Weiß (1988) verwendete bei Experimenten zur Aufklärung von Termination der T7 RNA Polymerase-Transkription im T7-System unter anderem auch das 3d^{riif} Fragment. Hier fand er für die Terminationsstruktur bei den Nukleotiden 53-76 eine Termination der von T7 RNA Polymerase vollzogenen RNA-Synthese von etwa 40 %, für den zweiten Terminator jedoch praktisch keine Terminationswirksamkeit. Interessanterweise findet sich etwa bei Position 360 eine mit 40-70 % - abhängig von der jeweiligen Nukleotidtriphosphatkonzentration - starke T7 RNA Polymerase-Termination, was umso erstaunlicher ist, als hier keinerlei Haarnadelstruktur vorliegt. Nimmt man diese Transkriptionsterminationen auch für *E. coli* RNA Polymerase als gegeben, so läßt sich die in dieser Arbeit gefundene fehlende Induktionsmöglichkeit von einem bezüglich des klonierten Fragmentes externen Plasmidpromotor leicht erklären. Allerdings sollte sich dieses Phänomen auch auf RNA-Ebene nachweisen lassen, was mit dem in Fig. 35 gezeigten Northern Blot gelungen ist.

Für die RNA-Synthese im T7-System mit T7 RNA Polymerase konnte Weiß (1988) eine sehr schwache Induktion (induziert durch Temperaturerhöhung) nachweisen, jedoch ist der Gehalt an mRNA, die von plasmidkodierter Sequenzen transkribiert wurde, und auch der Gehalt an entsprechenden Translationsprodukten schon ohne Induktion relativ hoch. Der Befund, daß die schwache Induktion der RNA-Synthese keine - nicht einmal ebenso schwache - Steigerung der Translation zur Folge hat, führt dazu, nicht nur Transkriptionskontrolle, sondern auch irgend eine Art posttranskriptionaler Kontrolle zu postulieren.

Eine Übertragung der Weiß'schen Resultate für eine Termination der T7 RNA Polymerase-Aktivität auf die in dieser Arbeit unternommenen Versuche einer Induktion der *E. coli* RNA Polymerase erscheint erlaubt, da z.B. auch für den Fall der *E. coli* *rrnB* Terminatoren T_1 und T_2 die Termination von T7 RNA Polymerase Transkription nachgewiesen ist (Steen *et al.* 1986). Da selbst im T7-System trotz des im Vergleich zum *E. coli* *tac*-Promotor noch stärkeren T7 $\Phi 10$ Promotors keine Induktion der Proteinsynthese nachzuweisen ist, kann man im *E. coli* System auch keine zwingend erwarten.

Da das Protein IIb auf Grund seiner Aminosäuresequenz in der Membran von *E. coli* erwartet wurde und solche Proteine eventuell schwer nachzuweisen sind, wurde die Lokalisation des Proteins mit immunologischen Methoden untersucht. Dies sollte wegen der hohen Bindungskonstanten der Antikörper-Protein-Wechselwirkung von $10^7 - 10^8$ (Getzoff *et al.* 1987) leichter möglich sein. Die früher herrschende Meinung, hydrophile Regionen eines Proteins seien generell gute antigene Determinanten und eignen sich deswegen als Sequenzen für synthetische Oligopeptide zur Immunisierung, kann in so einfacher Form nicht richtig sein. So sind etliche Proteine bekannt, für die das so nicht zutrifft wie z.B. Myohemerythrin (Geysen *et al.* 1987). Viel wichtiger erscheint eine gute Löslichkeit des Peptids (Lerner *et al.* 1981), die allerdings auch mit der Hydrophilizität korrelieren kann.

Ob Immunglobuline, die gegen ein synthetisches Oligopeptid erzeugt worden waren, auch mit dem eigentlichen nativen oder denaturierten Protein reagieren, hängt in erster Linie davon ab, ob die Peptidsequenz sich beim nativen Protein an der Oberfläche befindet.

Die Sekundärstruktur des Oligopeptids ist erstaunlicherweise nicht besonders relevant (Green *et al.* 1982). Aus Röntgenstrukturanalysen werden für ein typisches Epitop eine Größe von 6 Aminosäuren bei β -Faltblattstruktur, bis 10 Aminosäuren bei α -Helix als ausreichend angesehen, die eine 6 Å tiefe Tasche des Ausmaßes 15 x 6 Å bilden (Lerner *et al.* 1981). Das in dieser Arbeit verwendete Oligopeptid repräsentiert mit einiger Wahrscheinlichkeit also lediglich ein Epitop. Daher kann man schon theoretisch von hoher Spezifität ausgehen, die durch die gezeigten Versuche bestätigt werden konnte. So ist die mit den gereinigten Immunglobulinen präzipitierbare Proteinbande (Fig. 23) von gleicher Mobilität wie das 42 K Protein, welches auch in einem Western Blot mit den Antikörpern reagierte (Fig. 24). Das von den Kaninchen gewonnene Serum ist also in der Lage, spezifisch Protein IIb zu erkennen. Es sollte somit eine präparative Anreicherung dieses Proteins aus Membranen über eine Immunomatrix erlauben (Schneider *et al.* 1982). Besser erscheint mir zur Gewinnung von Protein IIb allerdings eine drastische Überexpression des Gens in geeigneten Zellen mit anschließender Aufreinigung des Extraktes über Immunoaffinitätschromatographie. Auf Grund der verschiedenen Terminatoren auf dem 3d^{rf} Fragment müßte das Gen vom 5'Ende partiell abgebaut werden (etwa 600 bp), so daß alle in dieser Arbeit als für Überexpression hemmend herausgestellten Sequenzen eliminiert sind. Eine weitere Möglichkeit zur Anreicherung wäre die Ausnutzung der Lösungseigenschaften des Detergens' Triton X-114 in Wasser bei verschiedenen Temperaturen, womit bereits die Phasenseparation von Acetylcholinesterase aus humaner Erythrocytenmembran, von Bacteriorhodopsin und der Cytochrom c Oxidase aus Hefe gelungen war (Bordier 1981).

Wegen seiner relativ hohen Hydrophobizität vermutete Heinrich (1987) das Protein IIB in der Membran von *E. coli* Zellen. Das von ihm festgestellte Fehlen eines sog. Signalpeptids (Nikaido und Wu 1984, von Heijne 1984) wertete er als Evidenz für eine Lokalisation in der inneren Membran. Proteine, die dort auch ohne Signalpeptid inkorporiert werden können, sind gut bekannt, wie das Beispiel der Proteine *HisP*, *HisQ*, *HisM* (Ames und Nikaido 1978) und der Genprodukte von *malF* und *malK* (Shuman *et al.* 1980) zeigt. Andere Beispiele sind bei Wolfe *et al.* (1983) und Yazyou *et al.* (1984) beschrieben. Hingegen ist für Proteine der äußeren Membran kein Beispiel ohne Signalpeptid bekannt (Inouye und Halegoua 1980). Zu berücksichtigen ist aber auch, daß das Signalpeptid alleine offenbar nicht ausreichend zur Bestimmung der Lokalisation ist (Wickner und Lodish 1985). So ist ein *lamB-lacZ* Fusionsprotein bekannt, bei welchem die Region zwischen den Aminosäuren 43 und 49 entscheidend für die korrekte Lokalisation ist (Benson *et al.* 1984). Die in der vorliegenden Arbeit belegte Lokalisation von Protein IIB in der cytoplasmatischen Membran steht also in keinem Widerspruch zu schon Bekanntem. Eine Homologie von Protein IIB zu einer als Consensus-Sequenz für Proteine zur Bindung und zum Transport kleiner hydrophober Moleküle wie β -Lactoglobulin oder Retinol-binding-Protein (Godovac-Zimmermann 1988) ist nicht vorhanden.

Weiteren Untersuchungen bleibt die Klärung vorbehalten, ob die Integration von Protein IIb in die cytoplasmatische Membran kotranslational oder posttranslational (Schatz 1986, Eilers und Schatz 1988) wie etwa der Transport der β -Lactamase durch die innere Membran (Koshland und Botstein 1980, 1982) vor sich geht.

Eine Anreicherung und Reinigung des Proteins sollte über die genaue Funktion Aufschluß geben.

So könnte man sich gut vorstellen, das gereinigte Protein in Proteoliposomen einzubauen und die Rifampicinpermeation zu messen ähnlich wie es für die Lactose-Permease bereits geschehen ist (Viitanen *et al.* 1985, siehe auch Mimms *et al.* 1981 oder Popot *et al.* 1981). Auch Experimente mit bakteriellen Membranvesikeln würden sich lohnen, um die Permeation aufzuklären.

Auf Grund der Übertragbarkeit der Rifampicinresistenz auf einen sensitiven Rezipientenstamm (Kollenda 1985, Heinrich 1987) durch Transformation wurde ein Gen-Dosis-Effekt postuliert. Diese Hypothese scheint mir nicht mehr haltbar, da durch Transformation chromosomal mutierter resistenter Stämme mit dem entsprechenden Wildtyp Fragment WT- α eine Umkehrung zu Sensitivität nicht erzielt werden kann (Tab. 3). Eine "Titration" des chromosomal kodierten Proteins mit dem plasmidkodierten ist hier nicht möglich. Damit scheidet meines Erachtens die Möglichkeit aus, daß das in der inneren Membran lokalisierte Protein IIb an der Formation einer Pore beteiligt sei. Wahrscheinlicher scheint mir das Verstopfen einer Pore selbst durch geringe Mengen an Protein IIb zu sein. Auch der Vorschlag, ob etwa durch die Mutation (Deletion von vier Guaninresten mit daraus resultierender Verschiebung eines Leserahmens) ein Protein entstehen kann, dessen Lokalisation sich geändert hat, muß in Erwägung gezogen werden. Sehr interessant wäre deshalb die Kenntnis der Lokalisation des unmutierten Proteins IIa.

Auszuschließen ist diese Möglichkeit eines Lokalisationswechsels nicht, da es, wie schon erwähnt, einerseits für die Translokation essentielle Sequenzen mitten im Protein gibt, andererseits durch den Austausch einer einzigen Aminosäure z.B. bei der Lipo- β -Lactamase die Lokalisation von der äußeren zur inneren Membran verändert werden konnte (Yamaguchi *et al.* 1988). Nicht nachgewiesen werden konnte in dieser Arbeit eine Veränderung von Rifampicin in lebenden Zellen oder in Zellextrakten (Fig. 39), auf der die Resistenz beruhen könnte. Das auf dem 3d^{rif} Fragment ebenfalls kodierende Protein I ist nur indirekt in das Resistenzphänomen involviert. Für die Manifestation relativ hoher Rifampicintoleranz ist es essentiell, jedoch wird auch bei Abwesenheit ein gewisser Resistenzgrad erreicht. Möglicherweise fungiert dieses Protein als eine Art Verstärker oder Kofaktor anderer Art des Proteins IIb.

Das in den letzten Jahren mehrfach beschriebene Phänomen einer relativ unspezifischen Resistenz eukaryotischer Zellen gegen verschiedene Cytostatika wie z.B. Vinblastin, Actinomycin D, Adriamycin, Daunomycin oder Colchicin verdient auch im Zusammenhang mit bakterieller Rifampicinresistenz einer Erwähnung. Für diese sog. "multi-drug" Resistenz wird das 1280 Aminosäuren große Produkt des Säugergens *mdrl*, das P-Glycoprotein, mit der relativen Molmasse von etwa 170 K verantwortlich gemacht (Juliano und Ling 1976, Kartner *et al.* 1983). Nach gegenwärtiger Vorstellung beruht der Aktionsmechanismus dieses integralen Plasmamembranproteins auf der Wirkung als Transportsystem für in die Zellen eingedrungene lipophile Drogen nach außen (Dano 1973, Willingham *et al.* 1986). Dieser Transport ist mit einer ATPase-Aktivität des Proteins verknüpft (Horio *et al.* 1988, Hamada und Tsuruo 1988), welches zwei Bindungsstellen für dieses Nukleotid besitzt (Chen *et al.* 1986, Gros *et al.* 1986).

Interessant für die Diskussion dieser Arbeit wird das P-Glycoprotein durch seine gute Homologie zu den bakteriellen Transportproteinen *HisP* (Higgins *et al.* 1982) aus *S. typhimurium* und *OppD* (Higgins *et al.* 1985) sowie der *E. coli* Transportproteine *MalK* (Gilson *et al.* 1982) und *PstB* (Surin *et al.* 1985) (Chen *et al.* 1986, Gros *et al.* 1986). Noch auffallender ist die hohe Homologie zu dem 66 K *E. coli* Membranprotein *HlyB*, welches in den Hämolysintransport involviert ist und ebenfalls ATPase-Aktivität besitzt (Gerlach *et al.* 1986). Ein Sequenzvergleich des Rifampicinresistenz vermittelnden Proteins *Iib* mit dem *Mdr1* Protein liefert allerdings keinerlei Hinweise auf aussagekräftige Homologien. Daher erscheint es mir sehr unwahrscheinlich, daß die hier untersuchte Rifampicinresistenz mit der "multi-drug" Resistenz eukaryotischer Zellen in Zusammenhang steht oder etwa eine verwandte evolutionäre Basis besitzt.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Ursache der durch das 2145 bp *Bam*HI Fragment 3d^{rif} erzeugten Resistenz von transformierten *E. coli* Zellen gegenüber dem Antibiotikum Rifampicin konnte alleine auf die Deletion von vier Guaninresten bei der Position 1262-1265 zurückgeführt werden. Die nicht ganz gesicherte Austauschmutation bei Position 227 ist für das Resistenzphänomen irrelevant.

Jede Verkürzung des 3d^{rif} Fragmentes führt zu einer deutlichen Herabsetzung der minimalen Hemmstoffkonzentration. Lediglich der Verlust von 61 bp am 3' Ende (außerhalb der Leserahmen) hat keinen Einfluß auf die Resistenz. Diese Befunde konnten durch Wachstumskurven bestätigt werden.

Expressionsstudien unter Verwendung verschiedener Vektoren, Promotoren und Wirtsstämme zeigten, daß beide auf 3d^{rif} befindlichen Leserahmen I und IIb zur Expression gebracht werden können. Eine Steigerung der Proteinbiosynthese durch Promotorinduktion konnte in keinem Fall erzielt werden. Da auch die Synthese von RNA induktionsunabhängig war, ist eine Kontrolle auf Transkriptionsebene zu folgern (z.B. Terminatoren).

Durch Immunisierung von Kaninchen mit einem synthetischen Oligopeptid aus dem Carboxyterminus von Protein IIb wurden Antisera erhalten, die eine klare Kreuzreaktion mit dem 42 K Protein IIb zeigten.

Mit Hilfe des Antiserums konnte Protein IIb als Bestandteil der inneren Membran von *E. coli* Zellen charakterisiert werden.

Bei Untersuchungen zur Funktion dieses Proteins wurden keine Rifampicin-verändernden Aktivitäten gefunden.

ANHANG

32
 GG ATC CAC AGG CTG CGA AGT AAT CAA TTC GTC
 62
 TGA AAG CTT GAG TAA CAA CGG AAA CCG GCC
 92
 ATT GCG CCG GTT TTT TTT GGC CTG AGT TCT
 122
 TAA TTA TCT TCG CGA ATT ATT TGC CCG AAA
 152
 TGT GAA GAG GGT CAT AAC CAC AGG TCA AGG
 182
 AGA AAC AAT TTA TAA GGT CAA AGA AAT ACT
 212
 ATT GCT CAG GTC TAT ACC GTA TAC TCC TTT
 242
 CAG CCA CAA AAA AAG TCA TGT TGG TTT CGC
 272
 AAG TTA CCC AGA GCA TGG AAG CAG GTT AAG
 302
 GCT TGC GGA GTG TCT GGC TGA CAG ATA ATC
 I 332
 GTC GAT GAG GGC AGT TTT ATG GAA AAG AAA
 Met Glu Lys Lys
 362
 CAC ATT TAT CTG TTT TGT TCT GCG GGC ATG
 His Ile Tyr Leu Phe Cys Ser Ala Gly Met
 392
 TCT ACC TCT TTA CTG GTA TCA AAA ATG CGC
 Ser Thr Ser Leu Leu Val Ser Lys Met Arg
 422
 GCA CAG GCA GAA AAA TAT GAA GTT CCG GTC
 Ala Gln Ala Glu Lys Tyr Glu Val Pro Val

452
 ATT ATT GAA GCA TTT CCG GAA ACA CTG GCT
 Ile Ile Glu Ala Phe Pro Glu Thr Leu Ala

482
 GGT GAA AAA GGT CAG AAT GCC GAT GTC GTG
 Gly Glu Lys Gly Gln Asn Ala Asp Val Val

512
 TTA TTA GGG CCG CAG ATT GCT TAT ATG TTG
 Leu Leu Gly Pro Gln Ile Ala Tyr Met Leu

542
 CCC GAA ATC CAG CGT TTG TTA CCC AAC AAA
 Pro Glu Ile Gln Arg Leu Leu Pro Asn Lys

572
 CCG GTT GAA GTA ATT GAC TCG CTG CTT TAT
 Pro Val Glu Val Ile Asp Ser Leu Leu Tyr

602
 GGC AAA GTC GAT GGT TTA GGC GTG CTT AAG
 Gly Lys Val Asp Gly Leu Gly Val Leu Lys

632
 GCT GCG GTT GCA GCG ATT AAA AAA GCC GCA
 Ala Ala Val Ala Ala Ile Lys Lys Ala Ala

662
 GCA AAT TAA TTT ATT TTA AAT TTT CCC GTC
 Ala Asn END

692
 AAA GAG TTA TTT CAT AAA TCA ATA CCG CAA

722
 TAT TTA AAT TGC GGT TTT TAA GGG TAT TTT

I Ib 752
 TCT ATG AGT AAT GTT ATT GCA TCG CTT GAA
 Met Ser Asn Val Ile Ala Ser Leu Glu

782
 AAG GTA CTC CTC CCT TTT GCA GTT AAA ATA
 Lys Val Leu Leu Pro Phe Ala Val Lys Ile

812
 GGA AAG CAG CCA CAC GTT AAT GCA ATC AAA
 Gly Lys Gln Pro His Val Asn Ala Ile Lys

842
 AAT GGC TTT ATT CGC TTA ATG CCG TTT AAC
 Asn Gly Phe Ile Arg Leu Met Pro Phe Asn

872
 CTT GCG GGG GCC ATG TTT GTA TTA ATT AAC
 Leu Ala Gly Ala Met Phe Val Leu Ile Asn

902
 AAC GTT TTT CTA AGC TTT GGG GAG GGG TCG
 Asn Val Phe Leu Ser Phe Gly Glu Gly Ser

932
 TTT TTT TAT TCC TTA GGT ATT CGC CTC GAC
 Phe Phe Tyr Ser Leu Gly Ile Arg Leu Asp

962
 GCC TCA ACC ATT GAA ACA CTT AAT GGT CTG
 Ala Ser Thr Ile Glu Thr Leu Asn Gly Leu

992
 AAA GGT ATT GGC GGC AAC GTA TAT AAC GGA
 Lys Gly Ile Gly Gly Asn Val Tyr Asn Gly

1022
 ACA TTA GGA ATA ATG TCT TTA ATG GCA CCG
 Thr Leu Gly Ile Met Ser Leu Met Ala Pro

1052
 TTC TTT ATT GGC ATG GCG CTG GCA GAA GAG
 Phe Phe Ile Gly Met Ala Leu Ala Glu Glu

1082
 CGT AAA GTC GAT GCG CTG GCG GCT GGG TTG
 Arg Lys Val Asp Ala Leu Ala Ala Gly Leu

1112
 TTA TCC GTT GCA GCA TTT ATG ACC GTC ACC
 Leu Ser Val Ala Ala Phe Met Thr Val Thr

1142
 CCA TAT AGT GTC GGT GAG GCC TAT GCG GTT
 Pro Tyr Ser Val Gly Glu Ala Tyr Ala Val

1172
 GGT GCA AAC TGG TTA GGT GGG GCG AAT ATC
 Gly Ala Asn Trp Leu Gly Gly Ala Asn Ile

1202
 ATC TCC GGG ATT ATT ATT GGC CTG GTG GTG
 Ile Ser Gly Ile Ile Ile Gly Leu Val Val

1232
 GCA GAA ATG TTT ACC TTT ATT GTC CGC CGC
 Ala Glu Met Phe Thr Phe Ile Val Arg Arg

1262
AAT TGG GTC ATT AAA CTG CCC GAC AGC GTA
Asn Trp Val Ile Lys Leu Pro Asp Ser Val

1292
CCT GCT TCA GTA TCG CGT TCC TTC TCG GCA
Pro Ala Ser Val Ser Arg Ser Phe Ser Ala

1322
TTA ATT CCC GGC TTT ATT ATT CTT TCC GTG
Leu Ile Pro Gly Phe Ile Ile Leu Ser Val

1352
ATG GGG ATT ATT GCC TGG GCG TTG AAT ACC
Met Gly Ile Ile Ala Trp Ala Leu Asn Thr

1382
TGG GGC ACC AAC TTC CAT CAG ATC ATT ATG
Trp Gly Thr Asn Phe His Gln Ile Ile Met

1412
GAT ACC ATC TCA ACC CCA CTG GCA TCG TTG
Asp Thr Ile Ser Thr Pro Leu Ala Ser Leu

1442
GGT AGC GTG GTG GGC TGG GCC TAT GTG ATC
Gly Ser Val Val Gly Trp Ala Tyr Val Ile

1472
TTT GTT CCA CTG CTC TGG TTC TTC GGT ATT
Phe Val Pro Leu Leu Trp Phe Phe Gly Ile

1502
CAT GGC GCG CTG GCG CTG ACC GCA CTG GAC
His Gly Ala Leu Ala Leu Thr Ala Leu Asp

1532
AAC GGC ATT ATG ACG CCG TGG GCA CTG GAA
Asn Gly Ile Met Thr Pro Trp Ala Leu Glu

1562
AAT ATC GCG ACC TAT CAG CAA TAT GGT TCC
Asn Ile Ala Thr Tyr Gln Gln Tyr Gly Ser

1592
GTC GAA GCG GCG CTG GCA GCC GGT AAG ACC
Val Glu Ala Ala Leu Ala Ala Gly Lys Thr

1622
TTC CAT ATC TGG GCC AAG CCG ATG CTG GAC
Phe His Ile Trp Ala Lys Pro Met Leu Asp

1652
TCC TTT ATT TTC CTT GGG GAA AAT GGT GCG
Ser Phe Ile Phe Leu Gly Glu Asn Gly Ala

1682
 ACT TTA GGC CTG ATC CTG GCT ATC TTT ATC
 Thr Leu Gly Leu Ile Leu Ala Ile Phe Ile

1712
 GCC TCT CGC CGT GCT GAT TAT CGT CAG GTG
 Ala Ser Arg Arg Ala Asp Tyr Arg Gln Val

1742
 GCA AAA CTG GCG CTG CCG TCC GGC ATC TTC
 Ala Lys Leu Ala Leu Pro Ser Gly Ile Phe

1772
 CAG ATT AAC GAA CCG ATT CTG TTT GGT CTG
 Gln Ile Asn Glu Pro Ile Leu Phe Gly Leu

1802
 CCA ATT ATC ATG AAC CCG GTG ATG TTT ATC
 Pro Ile Ile Met Asn Pro Val Met Phe Ile

1832
 CCG TTT GTA CTG GTA CAA CCG ATT CTG GCG
 Pro Phe Val Leu Val Gln Pro Ile Leu Ala

1862
 GCA ATC ACC CTC GCA GCG TAC TAC ATG GGC
 Ala Ile Thr Leu Ala Ala Tyr Tyr Met Gly

1892
 ATT ATT CCT CCG GTG ACC AAT ATT GCA CCG
 Ile Ile Pro Pro Val Thr Asn Ile Ala Pro

1922
 TGG ACC ATG CCA ACC GGT CTG GGA GCC TTC
 Trp Thr Met Pro Thr Gly Leu Gly Ala Phe

1952
 TTT AAC ACC AAC GGT AGC GTC GCC GCA TTG
 Phe Asn Thr Asn Gly Ser Val Ala Ala Leu

1982
 CTG GTC GCA CTC TTC AAC CTT GGC ATC GCA
 Leu Val Ala Leu Phe Asn Leu Gly Ile Ala

2012
 ACG TTA ATT TAT CTG CCC TTT GTT GTG GTG
 Thr Leu Ile Tyr Leu Pro Phe Val Val Val

2042
 GCT AAC AAA GCA CAA AAT GCG ATT GAT AAA
 Ala Asn Lys Ala Gln Asn Ala Ile Asp Lys

2072
 GAA GAG AGC GAA GAA GAT ATC GCT AAC GCC
 Glu Glu Ser Glu Glu Asp Ile Ala Asn Ala

CTG AAA TTT TAA TCG ATG CCG GTA CGG GTA 2102
 Leu Lys Phe END

ATC GTG CCG GTA AGA AAA GAG AGG AAC GAT 2132

GTA TGA TGG ATC C 2145

Fig. 41: DNA-Sequenz des 3drif Fragmentes

Die Proteinsequenz der Leserahmen I und IIb ist unter der Nukleotidsequenz angegeben.

	#	SITES	FRAGMENTS	FRAGMENT ENDS
ACC 1 (GTVWAC)	2			
		201	1783 (83.1)	362 2145
		362	201 (9.4)	1 201
			161 (7.5)	201 362
Acy 1 (Aha 2) (GPCGQC)	2			
		930	930 (43.4)	1 930
		1514	631 (29.4)	1514 2145
			584 (27.2)	930 1514
AHA 2 (GPCGQC)	2			
		930	930 (43.4)	1 930
		1514	631 (29.4)	1514 2145
			584 (27.2)	930 1514
AHA 3 (DRA 1) (BLUNT) (TTTAAA)	2			
		647	1450 (67.6)	695 2145
		695	647 (30.2)	1 647
			48 (2.2)	647 695
ALU 1 (BLUNT) (AGCT)	2			
		37	1260 (58.7)	885 2145
		885	848 (39.5)	37 885
			37 (1.7)	1 37
APY 1 (CCRGG)	4			
		1193	1193 (55.6)	1 1193
		1336	478 (22.3)	1667 2145
		1351	316 (14.7)	1351 1667
		1667	143 (6.7)	1193 1336
			15 (0.7)	1336 1351
AVA 2 (GGRCC)	1			
		1894	1894 (88.3)	1 1894
			251 (11.7)	1894 2145
BAM H1 (GGATCC)	2			
		1	2139 (99.7)	1 2140
		2140	5 (0.2)	2140 2145
			1 (0.0)	1 1
BAN 1 (GGQPCC)	2			
		1016	1016 (47.4)	1 1016
		1356	789 (36.8)	1356 2145
			340 (15.9)	1016 1356

BSP 1286 (G2GC3C)

2				
	1355	1355 (63.2)	1	1355
	1522	623 (29.0)	1522	2145
		167 (7.8)	1355	1522

BSSH 1 (GCGCGC)

2				
	389	1088 (50.7)	389	1477
	1477	668 (31.1)	1477	2145
		389 (18.1)	1	389

BST E2 (GGTNACC)

1				
	1874	1874 (87.4)	1	1874
		271 (12.6)	1874	2145

BST N1 (CCRGG)

4				
	1193	1193 (55.6)	1	1193
	1336	478 (22.3)	1667	2145
	1351	316 (14.7)	1351	1667
	1667	143 (6.7)	1193	1336
		15 (0.7)	1336	1351

BST X1 (CCANNNNNTGG)

1				
	1449	1449 (67.6)	1	1449
		696 (32.4)	1449	2145

CLA 1 (ATCGAT)

1				
	2084	2084 (97.2)	1	2084
		61 (2.8)	2084	2145

DDE 1 (CTNAG)

4				
	84	1231 (57.4)	914	2145
	187	695 (32.4)	187	882
	882	103 (4.8)	84	187
	914	84 (3.9)	1	84
		32 (1.5)	882	914

DPN 1 (GATC)

5				
	2	1371 (63.9)	2	1373
	1373	477 (22.2)	1664	2141
	1439	225 (10.5)	1439	1664
	1664	66 (3.1)	1373	1439
	2141	4 (0.2)	2141	2145
		2 (0.1)	1	2

DPN 1 (BLUNT) (GATC)

5				
	2	1371 (63.9)	2	1373
	1373	477 (22.2)	1664	2141
	1439	225 (10.5)	1439	1664
	1664	66 (3.1)	1373	1439
	2141	4 (0.2)	2141	2145
		2 (0.1)	1	2

EAE 1 (QGGCCP)

1

58	2087 (97.3)	58	2145
	58 (2.7)	1	58

ECO R5 (BLUNT) (GATATC)

1

2058	2058 (95.9)	1	2058
	87 (4.1)	2058	2145

FNU4H 1 (GCNGC)

18

11	480 (22.4)	11	491
491	341 (15.9)	1228	1569
563	201 (9.4)	1944	2145
603	185 (8.6)	788	973
612	158 (7.4)	630	788
627	146 (6.8)	1578	1724
630	136 (6.3)	1092	1228
788	106 (4.9)	1724	1830
973	99 (4.6)	1845	1944
1071	98 (4.6)	973	1071
1092	72 (3.4)	491	563
1228	40 (1.9)	563	603
1569	21 (1.0)	1071	1092
1578	15 (0.7)	1830	1845
1724	15 (0.7)	612	627
1830	11 (0.5)	1	11
1845	9 (0.4)	1569	1578
1944	9 (0.4)	603	612
	3 (0.1)	627	630

FNUD 2 (BLUNT) (CGCG)

5

103	886 (41.3)	390	1276
390	607 (28.3)	1538	2145
1276	287 (13.4)	103	390
1478	202 (9.4)	1276	1478
1538	103 (4.8)	1	103
	60 (2.8)	1478	1538

HAE 2 (PGCGCQ)

4

1037	1037 (48.3)	1	1037
1484	447 (20.8)	1037	1484
1571	424 (19.8)	1721	2145
1721	150 (7.0)	1571	1721
	22 (1.0)	59	81

HGA 1 (GACGC)

3

930	930	43.4)	1	930
1514	584	27.2)	930	1514
1939	425	19.8)	1514	1939
	206	(9.6)	1939	2145

HHA 1 (CFO 1) (GCGC)

10

66	647	(30.2)	391	1038
389	423	19.7)	1722	2145
391	412	(19.2)	1065	1477
1038	323	(15.1)	66	389
1065	150	7.0)	1572	1722
1477	87	4.1)	1485	1572
1479	66	3.1)	1	66
1485	27	(1.3)	1038	1065
1572	6	(0.3)	1479	1485
1722	2	(0.1)	1477	1479
	2	(0.1)	389	391

HIND 3 (AAGCTT)

2

36	1261	58.8)	884	2145
884	848	(39.5)	36	884
	36	1.7)	1	36

HINF 1 (GANTC)

4

558	1062	(49.5)	558	1620
1620	558	(26.0)	1	558
1757	322	(15.0)	1823	2145
1823	137	(6.4)	1620	1757
	66	(3.1)	1757	1823

HPA 2 (MSP 1) (CCGG)

14

57	634	29.6)	543	1177
69	348	(16.2)	69	417
417	282	(13.1)	1300	1582
438	185	(8.6)	1906	2091
543	150	(7.0)	1582	1732
1177	123	(5.7)	1177	1300
1300	105	(4.9)	438	543
1582	84	(3.9)	1788	1872
1732	57	(2.7)	1	57
1788	56	(2.6)	1732	1788
1872	36	(1.7)	2109	2145
1906	34	(1.6)	1872	1906
2091	21	(1.0)	417	438
2109	18	(0.8)	2091	2109
	12	(0.6)	57	69

HPH 1 (GGTGA)

6

453	665	(31.0)	1125	1790
1108	655	(30.5)	453	1108
1125	453	(21.1)	1	453
1790	271	(12.6)	1874	2145
1837	47	(2.2)	1790	1837
1874	37	(1.7)	1837	1874
	17	(0.8)	1108	1125

MAE 3 (GTNAC)

5

44	768 (35.8)	1107	1875
245	577 (26.9)	530	1107
530	285 (13.3)	245	530
1107	270 (12.6)	1875	2145
1875	201 (9.4)	44	245
	44 (2.1)	1	44

MBO 2 (GAAGA)

9

99	921 (42.9)	126	1047
126	415 (19.3)	1047	1462
1047	276 (12.9)	1462	1738
1462	225 (10.5)	1738	1963
1738	99 (4.6)	1	99
1963	90 (4.2)	2055	2145
2043	80 (3.7)	1963	2043
2052	27 (1.3)	99	126
2055	9 (0.4)	2043	2052
	3 (0.1)	2052	2055

MNL 1 (CCTC)

12

129	556 (25.9)	1128	1684
309	394 (18.4)	367	761
367	254 (11.8)	1869	2123
761	194 (9.0)	934	1128
894	180 (8.4)	129	309
926	157 (7.3)	1684	1841
934	133 (6.2)	761	894
1128	129 (6.0)	1	129
1684	58 (2.7)	309	367
1841	32 (1.5)	894	926
1869	28 (1.3)	1841	1869
2123	22 (1.0)	2123	2145
	8 (0.4)	926	934

MSP 1 (CCGG)

14

57	634 (29.6)	543	1177
69	348 (16.2)	69	417
417	282 (13.1)	1300	1582
438	185 (8.6)	1906	2091
543	150 (7.0)	1582	1732
1177	123 (5.7)	1177	1300
1300	105 (4.9)	438	543
1582	84 (3.9)	1788	1872
1732	57 (2.7)	1	57
1788	56 (2.6)	1732	1788
1872	36 (1.7)	2109	2145
1906	34 (1.6)	1872	1906
2091	21 (1.0)	417	438
2109	18 (0.8)	2091	2109
	12 (0.6)	57	69

MST 2 (CCTNAGG)

1

913	1232 (57.4)	913	2145
	913 (42.6)	1	913

MVN 1 (FNU D2.THA 1) (CGCG)

5

103	886	41.3)	390	1276
390	607	(28.3)	1538	2145
1276	287	(13.4)	103	390
1478	202	(9.4)	1276	1478
1538	103	(4.8)	1	103
	60	(2.8)	1478	1538

NCI 1 (CCSGG)

3

1177	1177	(54.9)	1	1177
1299	488	(22.8)	1299	1787
1787	358	(16.7)	1787	2145
	122	(5.7)	1177	1299

NDE 2 (MBO 2) (GATC)

5

2	1371	(63.9)	2	1373
1373	477	(22.2)	1664	2141
1439	225	(10.5)	1439	1664
1664	66	(3.1)	1373	1439
2141	4	(0.2)	2141	2145
	2	(0.1)	1	2

NRU 1 (BLUNT) (TCGCGA)

2

102	1435	66.9)	102	1537
1537	608	(28.3)	1537	2145
	102	(4.8)	1	102

RSA 1 (BLUNT) (GTAC)

6

756	756	(35.2)	1	756
1260	549	(25.6)	1260	1809
1809	504	(23.5)	756	1260
1815	244	(11.4)	1850	2094
1850	51	2.4)	2094	2145
2094	35	(1.6)	1815	1850
	6	(0.3)	1809	1815

SAU 1 (MST 2) (CCTNAGG)

1

913	1232	(57.4)	913	2145
	913	(42.6)	1	913

SAU 3A (MBO 1) (GATC)

5

2	1371	(63.9)	2	1373
1373	477	(22.2)	1664	2141
1439	225	(10.5)	1439	1664
1664	66	(3.1)	1373	1439
2141	4	(0.2)	2141	2145
	2	(0.1)	1	2

SAU96 1 (GGNCC)

5

489	579	(27.0)	850	1429
850	489	(22.8)	1	489
1429	361	(16.8)	489	850
1603	291	(13.6)	1603	1894
1894	251	(11.7)	1894	2145
	174	(8.1)	1429	1603

SCR F1 (CCNGG)

7

1177	1177 (54.9)	1	1177
1193	358 (16.7)	1787	2145
1299	316 (14.7)	1351	1667
1336	120 (5.6)	1667	1787
1351	106 (4.9)	1193	1299
1667	37 (1.7)	1299	1336
1787	16 (0.7)	1177	1193
	15 (0.7)	1336	1351

SFA N1 (GATGC)

7

741	741 (34.5)	1	741
1062	342 (15.9)	1062	1404
1404	321 (15.0)	741	1062
1613	240 (11.2)	1735	1975
1735	209 (9.7)	1404	1613
1975	122 (5.7)	1613	1735
2087	112 (5.2)	1975	2087
	58 (2.7)	2087	2145

SSP 1 (BLUNT) (AATAAT)

8

108	578 (26.9)	423	1001
423	534 (24.9)	1329	1863
1001	315 (14.7)	108	423
1182	282 (13.1)	1863	2145
1185	181 (8.4)	1001	1182
1308	123 (5.7)	1185	1308
1329	108 (5.0)	1	108
1863	21 (1.0)	1308	1329
	3 (0.1)	1182	1185

STU 1 (BLUNT) (AGGCCT)

2

1129	1129 (52.6)	1	1129
1658	529 (24.7)	1129	1658
	487 (22.7)	1658	2145

TAQ 1 (TCGA)

6

304	521 (24.3)	1564	2085
580	504 (23.5)	1060	1564
928	348 (16.2)	580	928
1060	304 (14.2)	1	304
1564	276 (12.9)	304	580
2085	132 (6.2)	928	1060
	60 (2.8)	2085	2145

Fig. 42: Restriktionsschnittstellen des 3d^{rif} Fragmentes

LITERATUR

- Aldwin, L. und Nitecki, D. E. (1987)
A Water-Soluble, Monitorable Peptide and Protein
Crosslinking Agent.
Anal. Biochem. **164**, 494-501.
- Amann, E.; Brosius, J. und Ptashne, M. (1983)
Vectors bearing a hybrid *trp-lac* promoter useful for
regulated expression of cloned genes in *Escherichia coli*.
Gene **25**, 167-178.
- Ames, G. F.-L. und Nikaido, K. (1978)
Identification of a membrane protein as histidine transport
component in *Salmonella typhimurium*.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA **75**, 5447-5451.
- Bachmann, B. J. (1987)
Derivations and Genotypes of Some Mutants of *Escherichia coli*
K12 in "Escherichia coli and Salmonella typhimurium Cellular
and Molecular Biology" Neidhardt F. C. Ed.
American Society for Microbiology, Washington D.C.
- Backman, K. und Boyer, H. W. (1983)
Tetracycline resistance determined by pBR322 is mediated by
one polypeptide.
Gene **26**, 197-203.
- Beckwith, J.; Grodzicker, T. und Arditti, R. (1972)
Evidence for two sites in the *lac* promoter region.
J. Mol. Biol. **69**, 155-162.
- Benson, S. A.; Bremer, E. und Silhavy, T. J. (1984)
Intragenic regions required for *LamB* export.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA **81**, 3830-3834.
- Bernatowicz, M. S. und Matsueda, G. R. (1986)
Preparation of Peptide-Protein Immunogens Using
N-Succinimidyl Bromoacetate as a Heterobifunctional
Crosslinking Reagent.
Anal. Biochem. **155**, 95-102.
- Bolton, A. E. und Hunter, W. M. (1973)
Labelling of proteins to high specific radioactivities by
conjugation to an iodine-125-containing acylating agent.
Application to the radioimmunoassay.
Biochem. J. **133**, 529-538.
- Bordier, C. (1981)
Phase Separation of Integral Membrane Proteins in
Triton X-114 Solution.
J. Biol. Chem. **256**, 1604-1607.

- Boyer, H. W. und Roulland-Dussoix, D. (1969)
A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*
J. Mol. Biol. **41**, 459-472.
- Brosius, J.; Dull, T. J.; Sleeter, D. D. und Noller, H. F. (1981)
Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*.
J. Mol. Biol. **148**, 107-127.
- Buchel, D.; Gronenborn, B. und Müller-Hill, B. (1980)
Sequence of the lactose permease gene.
Nature **283**, 541-545.
- Burnette, W. N. (1981)
"Western Blotting": Electrophoretic Transfer of Proteins from Sodium Dodecylsulfate-Polyacrylamide Gels to Unmodified Nitrocellulose and Radiographic Detection with Antibody and Radioiodinated Protein A.
Anal. Biochem. **112**, 195-203.
- Chaconas, G. und van De Sande, J. H. (1980)
5'-³²P Labelling of RNA and DNA restriction fragments.
Methods Enzymol. **65**, 75-85.
- Chamberlin, M. J. (1976)
RNA Polymerase (Losick, R. und Chamberlin, M., eds.) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
- Chang, A. C. Y. und Cohen, S. N. (1978)
Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from P15A cryptic miniplasmid.
J. Bacteriol. **134**, 1141-1156.
- Chen, C.; Chin, J. E.; Ueda, K.; Clark, D. P.; Pastan, I.; Gottesman, M. M. und Roninson, I. B. (1986)
Internal Duplication and Homology with Bacterial Transport Proteins in the *mdr1* (P-Glycoprotein) Gene from Multidrug-Resistant Human Cells.
Cell **47**, 381-389.
- Cronan, J. E.; Gennis, R. B. und Maloy, S. R. (1987)
Cytoplasmic Membrane in "*Escherichia coli* und *Salmonella typhimurium* Cellular and Molecular Biology" Neidhardt F. C. Ed. American Society for Microbiology, Washington D.C.
- Dano, K. (1973)
Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells.
Biochem. Biophys. Acta **323**, 466-483.
- De Blas, A. L. und Cherwinski, H. M. (1983)
Detection of Antigens on Nitrocellulose Paper Immunoblots with Monoclonal Antibodies.
Anal. Biochem. **133**, 214-219.

- De Boer, H. A.; Comstock, L. J. und Vasser, M. (1983)
The *tac* promoter: A functional hybrid derived from the *trp*
and *lac* promoters.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 80, 21-25.
- Diersch, H. (1986)
Einfluß des Immunsuppressivums Ovalicin auf den Stoffwechsel
ribosomaler RNA in S49.1 Lymphomzellen
Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-
Maximilians-Universität, München
- Dugaiczyk, A.; Boyer, H. W. und Goodman, H. M. (1975)
Ligation of *EcoRI* Endonuclease-generated DNA Fragments into.
Linear and Circular Structures.
J. Mol. Biol. 96, 171-184.
- Eilers, M. und Schatz, G. (1988)
Protein Unfolding and the Energetics of Protein
Translocation across Biological Membranes.
Cell 52, 481-483.
- Engvall, E.; Jonsson, K. und Perlmann, P. (1971)
Enzyme-linked Immunosorbent Assay. II. Quantitative Assay of
Protein Antigen, Immunoglobulin G, by Means of Enzyme-
labelled Antigen and Antibody-coated Tubes.
Biochem. Biophys. Acta 251, 427-432.
- Erlanger, B. F. (1980)
The Preparation of Antigenic Hapten-Carrier Conjugates: A
Survey.
Methods in Enzym. 70, 85-104.
- Fowler, T.; Taylor, L. und Thompson, R. (1983)
The control region of the F plasmid Transfer operons: DNA
sequence of the *traJ* and *traY* genes and characterisation of
the *traY-Z* promoter.
Gene 26, 79-89.
- Gaastra, W. und Jörgensen, P. L. (1984)
The Extraction and Isolation of DNA from Gels.
Methods in Molecular Biology; 2. NUCLEIC ACIDS 67-76.
- Gale, E. F.; Cundcliffe, F.; Reynolds, P. F.; Richmond, M.
H. und Waring, M. J., Eds. (1981)
The Molecular Basis of Antibiotic Action.
2nd ed., John Wiley and Sons, London.
- Gerlach, J. H.; Endicott, J. A.; Juranka, P. F.; Henderson,
G.; Sarangi, F.; Deuchars, K. L. und Ling, V. (1986)
Homology between P-Glycoprotein and a bacterial haemolysin
transport protein suggests a model for multidrug resistance.
Nature 324, 485-489.
- Getzoff, E. D.; Geysen, H. M.; Rodda, S. J.; Alexander, H.;
Tainer, J. A. und Lerner, R. A. (1987)
Mechanisms of Antibody Binding to a Protein.
Science 235, 1191-1196.

- Geysen, H. M.; Tainer, J. A.; Rodda, S. J.; Mason, T. J.; Alexander, H.; Getzoff, E. D. und Lerner, R. A. (1987)
Chemistry of Antibody Binding to a Protein.
Science **235**, 1184-1190.
- Gilson, E.; Nikaido, H. und Hofnung, M. (1982)
Sequence of the *malK* gene in *E. coli* K12.
Nucleic Acids Res. **10**, 7449-7458.
- Glauert, A. M. und Thornley, M. J. (1969)
The topography of the bacterial cellwall.
Annu. Rev. Microbiol. **23**, 159-198.
- Godovac-Zimmermann, J. (1988)
The structural motif of beta-lactoglobulin and retinol-binding protein: a basic framework for binding and transport of small hydrophobic molecules?
TIBS **13**, 64-66.
- Gold, L.; Pribnow, D.; Schneider, T.; Shinedling, S.; Singer, B. S. und Stormo, G. (1981)
Translational initiation in prokaryotes.
Annu. Rev. Microbiol. **35**, 365-403.
- Green, N.; Alexander, H.; Olson, A.; Alexander, S.; Shinnick, T. M.; Sutcliffe, J. G. und Lerner, R. A., (1982)
Immunogenic Structure of the Influenza Virus Hemagglutinin.
Cell **28**, 477-487.
- Gros, P.; Croop, J. und Housman, D. (1986)
Mammalian Multidrug Resistance Gene: Complete cDNA Sequence Indicates Strong Homology to Bacterial Transport Proteins.
Cell **47**, 371-380.
- Höb, A.; Arthur, A.; Wanner, G. und Fanning, E. (1988)
Use of ion exchange resin to recover poorly soluble recombinant proteins in active form from bacterial extracts.
Biotechnology, im Druck
- Hamada, H. und Tsuruo, T. (1988)
Purification of the 170- to 180-Kilodalton Membrane Glycoprotein Associated with Multidrug Resistance.
J. Biol. Chem. **263**, 1454-1458.
- Harder, K. J.; Nikaido, H. und Matsushashi, M. (1981)
Mutants of *Escherichia coli* that are resistant to certain beta-lactam compounds lack the *ompF* porin.
Antimicrob. Agents Chemother. **20**, 549-552.
- Hartmann, G. R.; Heinrich, P.; Kollenda, M. C.; Skrobranek, B.; Tropschug, M. und Weiß, W. (1985)
Molekulare Wirkungsweise des Antibiotikums Rifampicin.
Angew. Chem. **97**, 1011-1017.

- Hartmann, G. R.; Honikel, K. O.; Knüsel, F. und Nüesch, J.,
(1967)
The specific inhibition of the DNA-directed RNA synthesis by rifamycin.
Biochim. Biophys. Acta **145**, 843-844.
- Heinrich, P. (1986)
Guidelines for quick and simple Plasmid Sequencing
Boehringer Mannheim GmbH Biochemica, Mannheim
- Heinrich, P. (1987)
Klonierung und Sequenzierung von Rifampicinresistenzgenen.
Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Herrmann, S. H. und Mescher, M. F. (1979)
Purification of the H-2Kk Molecule of the Murine Major
Histocompatibility Complex.
J. Biol. Chem. **254**, 8713-8716.
- Higgins, C. F.; Haag, P. D.; Nikaido, K.; Ardeshir, F.;
Garcia, G. und Ames, G. F.-L. (1982)
Complete nucleotide sequence and identification of membrane
components of the histidine transport operon of *S.*
typhimurium.
Nature **298**, 723-727.
- Higgins, C. F.; Hiles, I. D.; Whalley, K. und Jamieson, D.
J. (1985)
Nucleotide binding by membrane components of bacterial
periplasmic binding protein-dependent transport systems.
EMBO J. **4**, 1033-1040.
- Horio, M.; Gottesman, M. M. und Pastan, I. (1988)
ATP-dependent transport of vinblastine in vesicles from
human multidrug-resistant cells.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA **85**, 3580-3584.
- Hurn, B. A. L. und Chantler, S. M. (1980)
Production of Reagent Antibodies.
Methods Enzymol. **70**, 104-142.
- Inouye, M. und Halegoua, S. (1980)
Secretion and membrane localization of proteins in
Escherichia coli.
Crit. Rev. Biochem. **7**, 339-344.
- Jaurin, B.; Grundström, T.; Edlund, T. und Normark, S.,
(1981)
The *E. coli* beta-lactamase attenuator mediates growth rate-
dependent regulation.
Nature **290**, 221-225.
- Juliano, R. L. und Ling, V. (1976)
A surface glycoprotein modulating drug permeability in
Chinese hamster ovary cell mutants.
Biochim. Biophys. Acta **455**, 152-162.

- Kartner, N.; Riordan, J. R. und Ling, V. (1983)
Cell surface P-glycoprotein associated with multidrug resistance in mammalian cell lines.
Science **221**, 1285-1288.
- Kaufmann, S. H.; Ewing, C. M. und Shaper, J. H. (1987)
The Erasable Western Blot.
Anal. Biochem. **161**, 89-95.
- Kollenda, M. C. (1981)
Vergleichende Membranuntersuchungen an Rifampicin-Eindringungsresistenten Mutanten und Transduktanten von *Escherichia coli*.
Diplomarbeit, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Kollenda, M. C. (1985)
Charakterisierung eines Rifampicinresistenz vermittelnden Gens aus *Escherichia coli*.
Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Koshland, D. und Botstein, D. (1980)
Secretion of β -lactamase requires the carboxy end of the protein
Cell **20**, 749-760.
- Koshland, D. und Botstein, D. (1982)
Evidence for Posttranslational Translocation of beta-Lactamase across the Bacterial Inner Membrane.
Cell **30**, 893-902.
- Laemmli, U. K. (1970)
Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4.
Nature **227**, 680-685.
- Lerner, R. A.; Sutcliffe, J. G. und Shinnick, T. M. (1981)
Antibodies to Chemically Synthesized Peptides Predicted from DNA Sequences as Probes of Gene Expression.
Cell **23**, 309-310.
- Lin, W. und Kasamatsu, H. (1983)
On the Electrotransfer of Polypeptides from Gels to Nitrocellulose Membranes.
Anal. Biochem. **128**, 302-311.
- Lisitsyn, N. A.; Sverdlov, E. D.; Moiseyeva, E. P.; Danilevskaya, O. N. und Nikiforov, V. G. (1984)
Mutation of Rifampicin resistance at the beginning of the RNA polymerase beta subunit in *Escherichia coli*.
Mol. Gen. Genet. **196**, 173-174.
- Lugtenberg, B.; Meijers, J.; Peters, R.; van Der Hoek, P.; and van Alphen, L. (1975)
Electrophoretic Resolution of the "Major Outer Membrane Protein" of *Escherichia coli* K12 into Four Bands.
FEBS Lett. **58**, 254-258.

- Lugtenberg, B. und van Alphen, L. (1983)
Molecular architecture and functioning of the outer membrane of *Escherichia coli* and other gram-negative bacteria.
Biochim. Biophys. Acta **737**, 51-115.
- Maggi, N.; Pasqualucci, C. R.; Ballotta, R. und Sensi, P., (1966)
Rifampicin: a new orally active rifamycin.
Chemotherapia **11**, 285-292.
- Maniatis, T.; Fritsch, E. F. und Sambrook, J. (1982)
Molecular cloning. A laboratory manual.
Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- McLaughlin, J. R.; Murray, C. L. und Rabinowitz, J. C., (1981)
Unique features in the ribosome binding site sequence of the Gram positive *Staphylococcus aureus* beta-lactamase gene.
J. Biol. Chem. **256**, 11283-11291.
- Messing, J.; Crea, R. und Seeburg, P. H. (1981)
A system for shotgun DNA sequencing.
Nucleic Acids Res. **9**, 309-321.
- Mimms, G. T.; Zampighi, G.; Nozaki, Y.; Tanford, C. und Reynolds, J. A. (1981)
Phospholipid Vesicle Formation and Transmembrane Protein Incorporation Using Octyl Glucoside.
Biochemistry **20**, 833-840.
- Müller, W. (1986)
Fractionation of DNA restriction fragments with ion-exchangers for high-performance liquid chromatography.
Eur. J. Biochem. **155**, 203-212.
- Müller, W. (1986)
New phase supports for liquid-liquid partition chromatography of biopolymers in aqueous poly(ethyleneglycol)-dextran systems.
Eur. J. Biochem. **155**, 213-222.
- Müller-Hill, B.; Crapo, L. und Gilbert, W. (1968)
Mutants that make more *lac* repressor.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA **59**, 1259-1263.
- Murphy, R. F.; Imam, A.; Hughes, A. E.; McGucken, M. J.; Buchanan, K. D.; Conlon, J. M. und Elmore, D. T. (1976)
Avoidance of strongly chaotropic eluents for immunoaffinity chromatography by chemical modification of immobilized ligand.
Biochim. Biophys. Acta **420**, 87-96.
- Nikaido, H. (1976)
Outer membrane of *Salmonella typhimurium*: transmembrane diffusion of some hydrophobic substances.
Biochim. Biophys. Acta **433**, 118-132.

- Nikaido, H. (1979)
Die Permeabilität der äußeren Bakterienmembran.
Angew. Chem. **91**, 394-407.
- Nikaido, H. und Vaara, M. (1985)
Molecular basis of bacterial outer membrane permeability.
Microbiol. Rev. **49**, 1-32.
- Nikaido, H. und Wu, H. C. P. (1984)
Amino acid sequence homology among the major outer membrane protein of *Escherichia coli*.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA **81**, 1048-1052.
- O'Farrell, P. (1981)
Replacement synthesis method of labeling DNA fragments
Bethesda Research Labs *Focus* **3**, 1-3.
- Olins, P. O. und Nomura, M. (1981)
Regulation of the S10 Ribosomal Protein Operon in *E. coli*:
Nucleotide Sequence at the Start of the Operon.
Cell **26**, 205-211.
- Osborn, M.; Gander, J. E.; Parisi, E. und Carson, J., (1972)
Mechanism of Assembly of the Outer Membrane of *Salmonella typhimurium*; Isolation and Characterisation of Cytoplasmic and Outer Membrane.
J. Biol. Chem. **247**, 3962-3972.
- Ouchterlony, O. (1958)
Diffusion-in-gel methods for immunological analysis.
Prog. Allergy **5**, 1-78.
- Ovchinnikov, Y. A.; Monastyrskaya, G. S.; Gubanov, V. V.; Lipkin, V. M.; Sverdlov, E. D.; Kiver, I. F.; Bass, I. A.; Mindlin, S. Z.; Danielevskaya, O. N. und Khesin, R. B., (1981)
Primary structure of *Escherichia coli* RNA polymerase. Nucleotide substitution in the beta subunit gene of the rifampicin resistant rpoB255 mutant.
Mol. Gen. Genet. **184**, 536-538.
- Pharmacia (1986)
Affinity Chromatography: principles and methods
Laboratory Separation Division, Uppsala, Schweden
- Popot, J.-L.; Cartaud, J. und Changeux, J.-P. (1981)
Reconstitution of a Functional Acetylcholine Receptor.
Eur. J. Biochem. **118**, 203-214.
- Pribnow, D. (1975)
Bacteriophage T7 early promoters: Nucleotide sequences of two RNA polymerase binding sites.
J. Mol. Biol. **99**, 419-443.
- Rauschel, B. (1985)
Zur selektiven Transkription durch RNA Polymerase.
Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität, München.

- Reichlin, M. (1980)
Use of Glutaraldehyde as a Coupling Agent for Proteins and Peptides.
Methods in Enzym. **70**, 159-165.
- Richardson, C. C.; Schildkraut, C. L.; Vasken Aposhian, H. und Kornberg, A. (1964)
Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid
J. Biol. Chem. **239**, 222-228.
- Rigby, P. W. J.; Dieckmann, M.; Rhodes, C. und Berg, F., (1977)
Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I.
J. Mol. Biol. **113**, 237-251.
- Rosenbusch, J. P. (1974)
Characterization of the major envelope protein from *Escherichia coli*. Regular arrangement on the peptidoglycan and unusual dodecyl sulfate binding.
J. Biol. Chem. **249**, 8019-8029.
- Russel, M. und Model, P. (1984)
Replacement of the fip Gene of *Escherichia coli* by an Inactive Gene Cloned on a Plasmid.
J. Bacteriol. **159**, 1034-1039.
- Sanger, F.; Micklen, S. und Coulson, A. R. (1977)
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA **74**, 5463-5467.
- Schaller, H.; Gray, C. und Herrmann, K. (1975)
Nucleotide sequence of an RNA polymerase binding site from the DNA of Bacteriophage fd.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA **72**, 737-741.
- Schatz, G. (1986)
Protein translocation: A common mechanism for different membrane systems?
Nature **321**, 108-109.
- Schneider, C.; Newman, R. A.; Sutherland, D. R.; Asser, U.; and Greaves, M. F. (1982)
A One-step Purification of Membrane Proteins Using a High Efficiency Immunomatrix.
J. Biol. Chem. **257**, 10766-10769.
- Shine, J. und Dalgarno L. (1975)
Determinants of cistron specificity in bacterial ribosoms.
Nature **254**, 34-38.
- Shuman, H.; Silhavy, T. und Beckwith, J. (1980)
Labeling of Proteins with beta-Galactosidase by Gene Fusion.
J. Biol. Chem. **255**, 168-174.
- Silverstone, A. E.; Arditti, R. R. und Magazanik, B. (1970)
Catabolite-insensitive revertants of *lac* promoter mutants.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA **66**, 773-779.

- Spiegelberg, H. L. (1974)
Biological activities of immunoglobulines of different classes and subclasses.
Adv. Immunol. **19**, 259-294.
- Steen, R.; Dahlberg, A. E.; Lade, B. N.; Studier, F. W. und Dunn, J. J. (1986)
T7 RNA polymerase directed expression of the *Escherichia coli* *rrnB* operon.
EMBO J. **5**, 1099-1103.
- Surin, B. P.; Rosenberg, H. und Cox, G. B. (1985)
Phosphate-specific transport system of *Escherichia coli*: nucleotide sequence and gene-polypeptide relationships.
J. Bacteriol. **161**, 189-198.
- Sutcliffe, J. G. (1979)
Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR 322.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **43**, 77-90.
- Tabor, S. und Richardson, C. C. (1985)
A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA **82**, 1074-1078.
- Tait, R. C. und Boyer, H. W. (1978)
On the nature of tetracycline resistance controlled by the plasmid pSC101.
Cell **13**, 73-81.
- Tinoco, J. I.; Borer, P. N.; Dengler, B.; Levine, M. D.; Uhlenbeck, O. C.; Crothers, D. M. und Gralla, J. (1973)
Improved estimation of secondary structure in ribonucleic acid.
Nature New Biology **246**, 40-41.
- Tropschug, M. (1981)
Untersuchungen zur Aufnahme von Rifamycinen in *Escherichia coli* K12.
Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Vieira, J. und Messing, J. (1982)
The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers.
Gene **19**, 259-268.
- Viitanen, P. V.; Menick, D. R.; Sarkar, H. K.; Trumble, H. R. und Kaback, H. R. (1985)
Site-Directed Mutagenesis of Cysteine-148 in the *Lac* Permease of *Escherichia coli*: Effect on Transport, Binding, and Sulfhydryl Inactivation.
Biochem. **24**, 7628-7635.

- Von Heijne, G. (1984)
How Signal Sequences Maintain Cleavage Specificity.
J. Mol. Biol. **173**, 243-251.
- Voordrouw, G. und Brenner, S. (1985)
Nucleotide sequence of the gene encoding the hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough).
Eur. J. Biochem. **148**, 515-520.
- Wallace, R. B.; Jokelson, M. J.; Suggs, S. V.; Miyaski, K.; Bhatt, R. und Itakura, K. (1981)
A set of synthetic oligodeoxyribonucleotide primers for DNA sequencing in the plasmid vector pBR 322.
Gene **16**, 21-26.
- Wehrli, W. (1983)
Rifampin: Mechanisms of Action and Resistance.
Rev. Infect. Dis. **5**, 407-411.
- Weiβ, W. (1988)
Termination der Transkription von T7 RNA Polymerase.
Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München, in Vorbereitung.
- West Jr., R. W. und Rodriguez, R. L. (1982)
Construction and characterization of *E. coli* promoter-probe plasmid vectors. pBR322 derivatives with deletions in the tetracycline resistance promoter region.
Gene **20**, 291-304.
- Westman, E.; Eriksson, S.; Laas, T.; Pernemalm, P. und Sköld, S.-E. (1987)
Separation of DNA Restriction Fragments by Ion-Exchange Chromatography on FPLC Columns Mono P and Mono Q.
Anal. Biochem. **166**, 158-171.
- Wickner, W. T. und Lodish, H. F. (1985)
Multiple Mechanisms of Protein Insertion Into and Across Membranes.
Science **230**, 400-407.
- Wilson, W. L.; Graham, K. C. und Lebel, M. C. (1977)
Thin-layer chromatographic identity and purity test for rifampin.
J. Chromat. **144**, 270-274.
- Winberg, G. und Hammar-skjöld, M. L. (1980)
Isolation of DNA from agarose gels using DEAE-paper. Application to restriction site mapping of adenovirus type 16 DNA.
Nucleic Acids Res. **8**, 253-264.
- Witholt, B.; Boekhout, M.; Kingma, J.; van Heerikhuizen, H. und Deleij, L. (1976)
An Efficient and Reproducible Procedure for the Formation of Spheroblasts from Various Grown *Escherichia coli*.
Anal. Biochem. **74**, 160-170.

- Wolfe, P. B.; Wickner, W. und Goodman, J. M. (1983)
Sequence of the leader peptidase gene of *E. coli* and the orientation of leader peptidase in bacterial envelope.
J. Biol. Chem. **258**, 12073-12080.
- Yamaguchi, K.; Yu, F. und Inouye, M. (1988)
A Single Amino Acid Determinant of the Membrane Localization of Lipoproteins in *E. coli*.
Cell **53**, 423-432.
- Yanisch-Perron, C.; Vieira, J. und Messing, J. (1985)
Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mpl8 and pUC19 vectors.
Gene **33**, 103-119.
- Yazyu, H.; Shiota-Niija, S.; Shimamoto, T.; Kanazawa, H.; Futai, M. und Tsuchiya, T. (1984)
Nucleotide Sequence of the *melB* Gene and Characteristics of Deduced Amino Acid Sequence of the Melibiose Carrier in *Escherichia coli*.
J. Biol. Chem. **259**, 4320-4326.
- Zubay, G.; Schwartz, D. und Beckwith, J. (1970)
Mechanism of activation of catabolite-sensitive genes: A positive control system.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA **66**, 104-109.

LEBENS LAUF

Name: Bernhard Skrobranek

geboren: 17. 4. 1959

Geburtsort: München

Eltern: Hubert und Inge Skrobranek geb. Wagner
Bankkaufleute

Familienstand: verheiratet seit 10. 5. 1985 mit der
Dipl.-Chemikerin Brigitte Obermaier

Ausbildung

Sept. 1965 - Juli 1969	Grundschule Berg-am-Laim, München
Sept. 1969 - Juli 1978	Wilhelmsgymnasium (humanistisch), München
Juni 1978	Abitur
Nov. 1978 - Dez. 1984	Studium der Chemie an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
	Vordiplom
Nov. 1983	Diplomhauptprüfung
Jan. 1984 - Dez. 1984	Diplomarbeit am Institut für Biochemie der Ludwig-Maximilians-Universität, München unter Anleitung von Prof. Dr. G. R. Hartmann Titel: Über die Diphosphorolyse von Di- nukleotiden und ihre Beeinflussung durch Rifampicin
ab Jan. 1985	Doktorarbeit am selben Institut unter Anleitung von Prof. Dr. G. R. Hartmann

ABKURZUNGEN

BSA	Rinderserumalbumin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin
LB-Medium	Luria Broth Medium S.
NET-Puffer	NaCl-EDTA-Tris Puffer S.
OD	Optische Dichte
PBS-Puffer	Phosphat-NaCl Puffer S.
PER	Ammoniumperoxodisulfat
SSC-Puffer	NaCl-Na-citrat Puffer S.
SSPE-Puffer	NaCl-Phosphat-EDTA Puffer S.
STE-Puffer	SDS-Tris-EDTA Puffer S.
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA Puffer S.
TBS-Puffer	Tris-NaCl Puffer S.
TE-Puffer	Tris-EDTA Puffer S.
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylen di amin
trx	Thioredoxin
U	Aktivitätseinheit (Definition je nach Hersteller unterschiedlich)
Upm	Umdrehungen pro Minute
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoyl- β -D-galactosid

